

Aus der
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München



Die antibakterielle Wirkung von Hinokitiol und Zink

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Anna Maria Seegerer

aus
Prien am Chiemsee

Jahr
2026

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Dr. Matthias Folwaczny
Zweites Gutachten: Prof. Dr. Nicoleta Ilie
Drittes Gutachten: Priv. Doz. Dr. Tobias Graf

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2026

Meiner Mutter

Inhalt

1. Einleitung und Literaturübersicht	1
1.1. Karies.....	1
1.1.1. Definition	1
1.1.2. Epidemiologie	1
1.1.3. Ätiopathogenese	1
1.1.4. Klinik und Kariesprogression	1
1.1.5. Risikofaktoren.....	2
1.1.6. Therapie.....	2
1.2. Parodontitis.....	2
1.2.1. Definition	2
1.2.2. Klassifikation	2
1.2.3. Epidemiologie	3
1.2.4. Ätiopathogenese	3
1.2.5. Symptomatik.....	4
1.2.6. Risikofaktoren.....	4
1.2.7. Therapie.....	5
1.3. Periimplantitis.....	5
1.3.1. Definition	5
1.3.2. Diagnostik	5
1.3.3. Risikofaktoren.....	6
1.3.4. Die periimplantäre Infektion	6
1.3.5. Therapie.....	7
1.3.6. Auswirkungen der Oberflächentopografie von Implantaten auf die Entstehung von Periimplantitis	7
1.4. Mikrobieller Biofilm als Voraussetzung für die Entstehung von Karies, Parodontitis und Periimplantitis.....	8
1.5. Hinokitiol und Zink als potentiell antibakteriell wirksame Substanzen	9
1.5.1. Hinokitiol.....	9
1.5.2. Zink	11
1.5.3. Synergismus zwischen Zink und Hinokitiol.....	12
1.5.4. Therapieansätze mit Zink im oralen Milieu	13
2. Ziele der Studie	14

3.	Material und Methoden	15
3.1.	Verwendete Materialien	15
3.2.	Methoden	15
3.2.1.	Agardiffusionstests	15
3.2.2.	In-vitro-(De-)Kontamination von Titanimplantaten	21
3.3.	Statistische Auswertung	25
4.	Ergebnisse	26
4.1.	Agardiffusionstests	26
4.1.1.	<i>Streptococcus mutans</i>	26
4.1.2.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	30
4.1.3.	<i>Actinomyces viscosus</i>	31
4.1.4.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	33
4.1.5.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	34
4.2.	Antibakterielle Effekte auf Titanimplantaten	36
4.2.1.	Qualitative rasterelektronenmikroskopische Analyse	36
4.2.2.	Quantifizierung der auf den Implantaten verbliebenen Bakterien mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay	44
5.	Diskussion	46
5.1.	Auswahl kariogener und parodontalpathogener Bakterien	46
5.2.	Agardiffusionstests	46
5.2.1.	Diskussion der Methode	46
5.2.2.	Diskussion der Ergebnisse	47
5.3.	In-vitro-(De-)Kontamination von Titanimplantaten	55
5.3.1.	Diskussion der Methoden	55
5.3.2.	Diskussion der Ergebnisse	57
6.	Zusammenfassung	62
7.	Abstract	63

8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Abbildungsverzeichnis.....	79
10.	Tabellenverzeichnis.....	85
11.	Abkürzungsverzeichnis.....	86
12.	Anhang	89
12.1.	Verwendete Materialien.....	89
12.2.	Wachstumskurven	92
12.2.1.	Wachstumskurve <i>Streptococcus mutans</i>	92
12.2.2.	Wachstumskurve <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	92
12.2.3.	Wachstumskurve <i>Actinomyces viscosus</i>	93
12.3.	Statistische Auswertung der Agardiffusionstests	93
12.3.1.	<i>Streptococcus mutans</i>	93
12.3.2.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	100
12.3.3.	<i>Actinomyces viscosus</i>	103
12.3.4.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	105
12.3.5.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	108
12.4.	Statistische Auswertung der Bakterienquantifizierung auf Implantaten mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay	111
13.	Danksagung	115
14.	Affidavit.....	116
15.	Übereinstimmungserklärung	117

1. Einleitung und Literaturübersicht

1.1. Karies

1.1.1. Definition

Karies bezeichnet die Demineralisation und Schädigung von Zahnhartsubstanz durch organische Säuren, die von kariogenen Mikroorganismen produziert werden (1), und stellt eine der Hauptursachen für Zahnverlust und Schmerzen in der Mundhöhle dar (2).

1.1.2. Epidemiologie

Die fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V), die im Jahr 2016 erschienen ist, verzeichnet insgesamt einen deutlichen Rückgang der Karieserfahrung bei Menschen in Deutschland. Trotzdem sind in allen Altersgruppen, abgesehen von den zwölfjährigen Kindern, bei denen 81 % der Gebisse kariesfrei waren, beinahe alle Studienteilnehmer von Karies betroffen. Der DMFT-Index, der die Anzahl an kariösen, fehlenden und mit Füllungen versehenen Zähnen beschreibt, steigt mit zunehmendem Alter an: Bei Kindern beträgt er 0,5, bei jüngeren Erwachsenen (35-44 Jahre alt) 11,2, bei jüngeren Senioren (im Alter von 65-74 Jahren) 17,7 und bei älteren Senioren mit 75-100 Jahren 21,6 (3).

1.1.3. Ätiopathogenese

Bei Karies handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung; u.a. spielen das Vorhandensein azidogener und azidophiler Mikroorganismen, Kohlenhydrate aus der Nahrung, genetische sowie sozioökonomische und Verhaltensfaktoren eine wichtige Rolle. Kariogene Mikroorganismen produzieren aus Kohlenhydraten der Nahrung organische Säuren, die zu einem pH-Wert-Abfall führen (2). Die saure Umgebung bewirkt eine Selektion säuretoleranter Bakterienarten und damit eine Abnahme der Diversität bzw. eine Störung des Gleichgewichts innerhalb des oralen Biofilms. Bleibt die kritische Absenkung des pH-Werts über einen längeren Zeitraum bestehen, wird die Zahnhartsubstanz demineralisiert (1). Bakterien, die eine zentrale Rolle im Rahmen der Kariogenese spielen, sind u.a. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) und andere Streptokokken; Actinomyceten und Lactobazillen (1, 2). *Streptococcus mutans* wird neben anderen Streptokokken am häufigsten in kariös bedingten Läsionen nachgewiesen (1).

1.1.4. Klinik und Kariesprogression

Das erste Stadium einer kariösen Läsion bildet die sog. Initial- bzw. Schmelzkaries. Hierbei findet unter einer intakt erscheinenden Schmelzoberfläche eine Demineralisierung der Zahnhartsubstanz statt (1). Initialkaries kann durch entsprechende Präventionsmaßnahmen und Entfernung der schädlichen Einflüsse arretiert werden (4). Die nächste Progressionsstufe bildet die Dentinkaries. Im Dentin kann die Kariesausbreitung entlang der Dentinkanälchen bis zur Pulpa erfolgen und eine Pulpitis bedingen, die oft sehr schmerzhaft ist und bei Eindringen von großen Mengen an Bakterien in die Pulpa zu einer Pulpanekrose führen kann. Unbehandelt kann durch den Entzündungsprozess eine apikale Parodontitis mit Abbau des

Alveolarknochens im Bereich der Wurzelspitze des betroffenen Zahns oder gelegentlich sogar ein apikaler Abszess entstehen (1).

Auch an der Zahnwurzel kann sich Karies bilden, wenn die Wurzeloberfläche aufgrund von Rezessionen freiliegt. Die Wurzelkaries breitet sich relativ flächig aus und betrifft v.a. ältere Menschen (1).

1.1.5. Risikofaktoren

Das Risiko künftig kariöse Läsionen zu entwickeln, hängt, wie von Hellwig et al. (4) beschrieben, von diversen Parametern ab. Entscheidend sind neben der Mundhygiene des Patienten und der regelmäßigen zahnärztlichen Vorsorgeuntersuchung die Häufigkeit der Zuckerezufuhr. Ein weiterer Indikator für das Kariesrisiko besteht in der Häufigkeit des Auftretens kariöser Läsionen in den vergangenen Jahren. Das Risiko wird weiterhin durch einen geringen Speichelfluss, intensivere orale Besiedelung durch *Streptococcus mutans*, unzureichende Fluoridanwendung und – aus kariologischer Sicht – ungünstige genetische Faktoren hinsichtlich der Zahnmorphologie (z.B. tiefe Fissuren) gesteigert (4). Letzteren kommt jedoch nur eine untergeordnete Bedeutung zu (1).

1.1.6. Therapie

Die Kariestherapie hängt von der Progression der kariösen Läsion ab. Bei Initialkaries ist keine invasive Therapie indiziert – es reicht aus, eine Fluoridierung durchzuführen und die Risikofaktoren zu minimieren, beispielsweise indem die individuelle Mundhygiene verbessert und die Ernährungsgewohnheiten angepasst werden. Ist die kariöse Läsion bereits ins Dentin fortgeschritten und kavitiert, muss die Karies exkaviert und der Defekt der Zahnhartsubstanz mit einem geeigneten Füllungsmaterial versorgt werden. Bei Dentinkaries ohne Kavitation kann eine sog. Kariesinfiltration ausreichend sein, um die Karies zu stoppen (1). Dieses Verfahren ist jedoch kontraindiziert, wenn sich die Läsion bereits in das mittlere oder innere Dentindrittel ausgebreitet hat (4).

1.2. Parodontitis

1.2.1. Definition

In einem Report des *World Workshop on the Classification of Periodontal and Periimplant Diseases and Conditions* von 2017 wurde die Parodontitis definiert: „Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease associated with dysbiotic plaque biofilms and characterized by progressive destruction of the tooth-supporting apparatus. Its primary features include the loss of periodontal tissue support, manifested through clinical attachment loss (CAL) and radiographically assessed alveolar bone loss, presence of periodontal pocketing and gingival bleeding“ (5, p. 174).

1.2.2. Klassifikation

2018 wurde eine revidierte Klassifikation für parodontale Erkrankungen vorgestellt. Die neue Klassifikation unterscheidet drei Hauptgruppen: Nekrotisierende Parodontitis, Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen und die eigentliche Parodontitis. Zur letzten

Gruppe gehören alle klinischen Fälle einer Parodontitis, die nicht einer der ersten beiden Gruppen zugeordnet werden können (5). Diese werden weiterhin durch das sog. Staging und Grading genauer eingeteilt, wobei sich das Staging vorwiegend auf die Schwere und Ausdehnung der Erkrankung bezieht, während das Grading insbesondere die Prognose der Erkrankung und das bestehende Risiko in Bezug auf systemische Erkrankungen fokussiert, die mit der Parodontitis assoziiert sind (6).

1.2.3. Epidemiologie

Nach den Beobachtungen der DMS V ist in Deutschland insgesamt eine deutliche Abnahme von Parodontalerkrankungen zu verzeichnen, insbesondere schwerer Parodontalerkrankungen bei jüngeren Erwachsenen und jüngeren Senioren. Deren Anzahl hat sich im Vergleich zur früheren DMS IV (Jahr 2005) in etwa halbiert. Dennoch sind insgesamt nach wie vor sehr viele Menschen von Parodontalerkrankungen betroffen – in der Altersgruppe der 65-74-Jährigen beispielsweise über die Hälfte (3, 7). Insgesamt ist etwa jeder zweite Erwachsene von Parodontitis betroffen, 10 % von einer schweren Ausprägungsform (8).

1.2.4. Ätiopathogenese

Die Parodontitis ist nicht als klassische Infektionskrankheit anzusehen, die durch Übertragung bestimmter Bakterien verursacht wird. Vielmehr ist die Veränderung des oralen Biofilms hinsichtlich Menge und Einfluss verschiedener Bakterienarten im Sinne einer Dysbiose entscheidend (8). Durch die Dysbiose oder durch eine Überreaktion des Immunsystems des Wirts auf die Bakterien kommt ein Ungleichgewicht zwischen mikrobiellem Biofilm und Wirt zustande, das einen erhöhten Entzündungszustand zur Folge hat, der letztendlich zur Zerstörung des parodontalen Gewebes führt (9).

Obwohl ein dysbiotischer Biofilm alleine nicht ausreicht, um eine Parodontalerkrankung zu verursachen (9, 10), stellt er dennoch die Grundvoraussetzung für die Entstehung der Parodontitis (10) und der Biofilm-induzierten Gingivitis (9) dar. Letztere kann als Vorstufe der Parodontitis betrachtet werden. Die Gingivitis ist eine reversible Erkrankung, die sich auf das Gingivaepithel und das Bindegewebe beschränkt und zur Erhöhung der systemischen Entzündungsmarker (z.B. C-reaktives Protein) führen kann, wie Hajishengallis et al. (8) berichten. Ob sich jedoch aus der Gingivitis eine Parodontitis entwickelt, hängt von weiteren Faktoren ab, die in der Summe das individuelle Erkrankungsrisiko determinieren. Dazu gehören neben genetischen Faktoren beispielsweise auch Umweltfaktoren wie Rauchen und die individuelle Diät sowie systemische Erkrankungen – beispielsweise der Diabetes mellitus (8). Dies wird durch eine Studie von Löe et al. (11) mit Arbeitern auf einer Teeplantage in Sri Lanka verdeutlicht. Die Arbeiter führten keinerlei Mundhygienemaßnahmen durch. Alle Studienteilnehmer zeigten erheblichen Befall durch Plaque und Gingivitis. Nur ein Teil von ihnen entwickelte im Verlauf eine Parodontitis (11). Für die Entstehung der Parodontitis ist also ein prädisponierter Wirt entscheidend (12). Bisher konnte nicht abschließend geklärt

werden, welcher der in Frage kommenden Faktoren für eine derartige Prädisposition hauptverantwortlich ist (9).

Bei Entstehung einer Parodontitis führen Virulenzfaktoren verschiedener parodontopathogener Bakterien zur Aktivierung von intrinsischen Entzündungsreaktionen, wodurch wiederum die Produktion entzündungsfördernder Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und PGE_2 erhöht wird, wie Kwon et al. erläutern. Gemeinsam mit den Virulenzfaktoren der Bakterien bewirken die Zytokine die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen, welche eine Zerstörung des desmodontalen Bindegewebes verursachen. Die entzündungsfördernden Zytokine rufen außerdem indirekt die Aktivierung von Osteoklasten hervor, was einen vermehrten Knochenabbau zur Folge hat (13).

1.2.5. Symptomatik

Klinisch treten bei der Parodontitis Symptome wie Rötung, Schwellung und Blutung der Gingiva sowie erhöhte Taschensondierungstiefen (TST) als Zeichen eines weitgehend irreversiblen Verlusts des parodontalen Stützgewebes auf. In fortgeschrittenem Stadium kann es zu erhöhter Zahnbeweglichkeit (14) sowie zu Zahnverlusten (9) kommen. Ähnlich wie die Karies stellt auch die Parodontitis in fortgeschrittenem Stadium eine wesentliche Ursache für den Zahnverlust bei Erwachsenen dar (15).

1.2.6. Risikofaktoren

Van Dyke et al. definieren Risikofaktoren als Einflüsse, die mit einem vermehrten Auftreten einer Krankheit assoziiert sind, diese jedoch nicht primär verursachen (16). Beispielsweise ist der dysbiotische Biofilm zwar eine zwingende Voraussetzung für die Entstehung der Parodontitis, aber trotzdem verursacht der Biofilm nicht zwangsläufig bei jedem Menschen gleichermaßen eine parodontale Erkrankung (17). Bouchard et al. (17) grenzen klassische Risikofaktoren (u.a. das Vorhandensein von parodontalpathogenen Bakterien) von Risikoindikatoren (u.a. eine unzureichende Mundhygiene) und prädisponierenden Faktoren (z.B. das Geschlecht) ab. Die klassischen Risikofaktoren zeigen dabei den stärksten ätiopathogenetischen Einfluss auf die Parodontitis, während sich für Risikoindikatoren und prädisponierende Faktoren eine deutlich geringere Wirkung auf die Manifestation der Parodontitis beobachten lässt (17). Man unterscheidet beeinflussbare, extrinsische und das Verhalten betreffende Risikofaktoren, von nicht beeinflussbaren, intrinsischen Risikofaktoren. Als beeinflussbare Risikofaktoren gelten insbesondere das Rauchen und der Diabetes mellitus – eine Erkrankung, die zwar nicht geheilt, jedoch durch eine systematische Behandlung kontrolliert werden kann. Zudem besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Parodontitis und dem sozioökonomischen Status, Ernährungsgewohnheiten, Alkoholkonsum und Stress (16).

Als nicht modifizierbare Einflussgrößen gelten insbesondere genetische Faktoren. Für die genetische Prädisposition der Parodontitis ist laut Kinane et al. am ehesten ein komplexer Erbgang verantwortlich (9). In der Vergangenheit wurden einzelne Gene bzw. Polymorphismen, beispielsweise im Interleukin-1-Gen, mit einem erhöhten individuellen

Parodontitisrisiko in Zusammenhang gebracht (18, 19). Bei Interleukin-1 handelt es sich um ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, das u.a. entzündliche Reaktionen gegen parodontalpathogene Bakterien einleitet (19).

1.2.7. Therapie

Nach den aktuellen Leitlinien der DG Paro und DGZMK zur Parodontitistherapie stehen die Verbesserung der Mundhygiene, Kontrolle und Beseitigung von modulierenden Risikofaktoren sowie eine professionelle Zahnreinigung im Vordergrund. Im Rahmen der zweiten Therapiephase werden mittels subgingivaler Instrumentierung auf den Zahnwurzeln anhaftende Konkremente und der mikrobielle Biofilm entfernt bzw. modifiziert (20). In der Regel erfolgt die Therapie rein mechanisch durch subgingivale Instrumentierung; eine adjuvante antibiotische Therapie bleibt insbesondere jungen Patienten mit aggressivem Verlauf vorbehalten (20, 21). Nach Abschluss der initialen Therapiephase erfolgt nach ca. 3 Monaten die klinische Reevaluation des parodontalen Zustands und die Beurteilung der Heilung. In Abhängigkeit von den dabei erhobenen Befunden kann die Indikation für eine ergänzende chirurgische Parodontaltherapie gestellt werden. Die abschließende vierte Therapiephase umfasst die unterstützende Parodontaltherapie mit dem Ziel, den Therapieerfolg aufrechtzuerhalten und Rezidive frühzeitig einer erneuten Therapie zuzuführen (20).

1.3. Periimplantitis

1.3.1. Definition

Bei der Periimplantitis handelt es sich – wie auch bei der Parodontitis – um eine multifaktorielle, mit einer mikrobiellen Dysbiose assoziierte Erkrankung (22). Man unterscheidet zwei Arten periimplantärer Entzündungen: die periimplantäre Mukositis und die Periimplantitis. Bei ersterer beschränkt sich die Entzündung auf das an den Implantatthals angrenzende Weichgewebe, wohingegen bei einer Periimplantitis auch das ossäre Lagergewebe des Implantats betroffen ist (23). Die gewichtete durchschnittliche Prävalenz der Periimplantitis beträgt 22 %, die der periimplantären Mukositis ist knapp doppelt so hoch (24). Unbehandelt entsteht aus einer Mukositis in 44 % der Fälle eine Periimplantitis, eine Behandlung reduziert den Prozentsatz auf 18% (25).

1.3.2. Diagnostik

Ähnlich wie in der Diagnose der Parodontitis stellen die Erhebung der Taschensondierungstiefe sowie der Prävalenz der Sondierungsblutung (BOP; Bleeding on Probing) die zwei wichtigsten klinischen Befunde dar. Ergänzt werden die klinischen Befunde in der Regel durch eine Röntgendarstellung des erkrankten Implantats, anhand der das Knochenniveau im Vergleich zu einer Referenzaufnahme, die beim Einsetzen der Suprakonstruktion angefertigt wurde, beurteilt werden kann. Hierbei ist zu beachten, dass ein gewisser Knochenumbau im Zuge des Einheilungsvorgangs des Implantats (Remodelling) physiologisch ist (26). Der Umfang des Remodellings ist individuell unterschiedlich. Ohne Referenzdaten sprechen folgende Kriterien für das Vorhandensein einer Periimplantitis: ein

Knochenniveau von ≥ 3 mm apikal des am weitesten koronal gelegenen intraossären Implantatanteils; eine TST von ≥ 6 mm und Anwesenheit von BOP und/oder Suppuration bei Sondierung (27).

1.3.3. Risikofaktoren

Zentrale Risikofaktoren für die Entwicklung von periimplantären Entzündungen stellen die unzureichende Mundhygiene des Patienten sowie eine Parodontitis in der Vorgeschichte des Patienten dar, wie Herrera et al. (26) berichten. Weiterhin können Rauchen und Diabetes mellitus sowie lokale Faktoren wie zum Beispiel eine ungünstige Implantatposition, Zementreste und ein Mangel an keratinisierter Mukosa die Situation negativ beeinflussen. Der primär auslösende Faktor periimplantärer Erkrankungen ist jedoch die Manifestation eines dysbiotischen Biofilms (26).

1.3.4. Die periimplantäre Infektion

In der Mundhöhle existieren verschiedene ökologische Nischen mit unterschiedlichen Bedingungen (z.B. Sauerstoffgehalt, Temperatur, pH-Wert), die jeweils das Wachstum anderer Bakterienspezies fördern (2). Auch die periimplantäre Umgebung selbst stellt eine eigene ökologische Nische mit speziellen Bedingungen und einem entsprechenden Mikrobiom dar (23). Welche Mikroorganismen vorwiegend mit der Periimplantitis assoziiert sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Metaanalyse von Carvalho et al. (28) beschreibt zum Teil Überschneidungen der periimplantären Infektion mit typischen parodontalpathogenen Bakterien wie z.B. Vertretern des roten und orangen Komplexes. Andererseits scheinen jedoch auch völlig andere Bakterien wie z.B. *Staphylococcus epidermidis* bei der Manifestation der Periimplantitis von Bedeutung zu sein. Viele nicht-parodontalpathogene Bakterien sind in Bezug auf ihre mögliche Rolle hinsichtlich der periimplantären Infektion kaum untersucht; ihre ätio-pathogenetische Bedeutung ist somit noch unklar (28).

Kröger et al. (22) untersuchten die Veränderung des Mikrobioms in Abhängigkeit vom Schweregrad der Periimplantitis. Die Autoren beschreiben eine positive Korrelation zwischen wachsender Taschensondierungstiefe und zunehmender Dysbiose. Sie stellten fest, dass mit ansteigender TST die mikrobielle Diversität zugunsten anaerober, meist gramnegativer Bakterien abnimmt. Einige Bakterienspezies, die v.a. in tiefen periimplantären Taschen vertreten sind, sind gleichzeitig typische parodontalpathogene Bakterien bzw. auch mit Fällen einer schweren Parodontitis assoziiert. Insgesamt sind sowohl parodontalpathogene Bakterien als auch weitere spezifische Bakterien anzutreffen (22).

Verschiedene Studien zeigten, dass *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) ebenfalls in Periimplantitis-assoziierten Biofilmen häufig vorkommt. Insgesamt kann jedoch nach Sahrman et al. bislang für die Periimplantitis kein spezifisches Mikrobiom definiert werden (29).

1.3.5. Therapie

Die aktuelle S3-Leitlinie zur Therapie periimplantärer Entzündungen sieht für die Behandlung der periimplantären Mukositis die systematische mechanische Reinigung der erkrankten Implantatoberfläche vor. Außerdem soll der Patient dazu angehalten werden, seine Mundhygiene zu optimieren. Nachkontrollen sind ein weiterer Bestandteil des Therapiekonzepts. Bei einer Periimplantitis erfolgt zunächst eine nichtchirurgische Therapie. Hierfür kann Laserstrahlung oder Airpolishings mit Glycinpulver verwendet werden (30). Unterstützend können auch topische Antibiotika oder ein Chlorhexidin (CHX)-Trägerchip zum Einsatz kommen (31), wobei der Nutzen dieser therapeutischen Maßnahmen bislang nicht gesichert ist (26). Diese Verfahren werden in der aktuellen Leitlinie aus dem Jahr 2022 – im Gegensatz zur vorausgegangenen Version – nicht mehr empfohlen (30, 31). Wenn nötig, muss frühzeitig eine chirurgische Therapie mit Entfernung von Granulationsgewebe und Reinigung der Implantatoberfläche stattfinden. Bei fortgeschrittenem Knochenabbau, insbesondere bei Implantatlockerung, Therapieresistenz oder Übergreifen der Infektion auf Nachbarstrukturen, muss das Implantat entfernt werden (30).

1.3.6. Auswirkungen der Oberflächentopografie von Implantaten auf die Entstehung von Periimplantitis

Ein Dentalimplantat muss, wie Rupp et al. (32) beschreiben, in der Mundhöhle mit unterschiedlichen Gewebearten in einer möglichst stabilen und entzündungsfreien Wechselbeziehung stehen. Die Implantatoberflächen müssen deshalb je nach angrenzendem Gewebe verschiedene Aufgaben erfüllen. Der Teil, der an den Knochen angrenzt, sollte Eigenschaften aufweisen, welche die Osseointegration fördern bzw. osteoinduktive Fähigkeiten besitzen. Der an das Weichgewebe angrenzende Anteil des Implantats sollte die reizlose Adhäsion von Keratinozyten und Fibroblasten erlauben, sodass eine sichere epitheliale Abgrenzung des Implantatlagergewebes gegen bakterielle Infiltration gewährleistet werden kann. Letztere könnte die Osseointegration des Implantats schwächen, zum Knochenabbau und schlussendlich zum Verlust des Implantats führen. Die trans- bzw. supragingivale Implantatoberfläche sollte für die bakterielle Besiedelung möglichst unattraktive Eigenschaften aufweisen, damit die Zellen des Weichgewebes einen Vorteil gegenüber den Bakterien besitzen und das sog. „race for the surface“ (Rupp et al. meinen die Implantatoberfläche) für sich entscheiden können. Moderne Implantate weisen diverse Oberflächenmodifikationen auf, die durch subtraktive oder additive Verfahren geschaffen werden. Gängig sind beispielsweise sandgestrahlte, geätzte oder mit einer Kalzium-Phosphat-Beschichtung versehene Implantatoberflächen. Oftmals werden auch mehrere Methoden kombiniert. Studien, die sich mit der Oberflächenrauigkeit von Implantaten beschäftigen, zeigen, dass ein Sa-Wert zwischen einem und zwei Mikrometern, welcher eine moderat raue Titanoberfläche beschreibt, am besten für die Osseointegration eines Implantats geeignet ist. Allerdings können individuelle Oberflächentopografien nicht durch den Sa-Wert alleine beschrieben werden. Zur Einschätzung der Attraktivität für anheftende Bakterien müssen eine Reihe weiterer, zwei- und dreidimensionaler

ultrastruktureller Parameter herangezogen werden. Die Vorhersage der Wirkung einer Implantatoberfläche auf Mikroorganismen ist vorerst nur sehr eingeschränkt möglich, da die Bewertung von Mikro-, Submikro- und Nanorauheit von Implantatoberflächen nicht standardisiert ist (32).

Hsu et al. (33) untersuchten die Auswirkungen von Oberflächenstrukturen im Mikro- und Nanobereich auf die Bakterienadhäsion. Sie stellten fest, dass die Topografie einer Oberfläche die Adhäsion hinsichtlich Menge anhaftender Mikroorganismen und Orientierung der Zellen auf der Fläche beeinflusst. Die Zellen richten sich je nach Oberflächentopografie so aus, dass die entstehende Kontaktfläche möglichst groß ist (33). Neben Hsu et al. untersuchten auch Whitehead et al. dieses Phänomen. Auf rauen Oberflächen mit jeweils unterschiedlich großen Vertiefungen haften Bakterien, die ähnlich groß sind wie die Vertiefungen, besser, weil dadurch ein optimaler Oberflächenkontakt entsteht (33-35). Weiterhin stellten Hsu et al. fest, dass die Bakterien je nach Beschaffenheit der Oberfläche verschiedene membranständige Extrusionen exprimieren. Bei Oberflächen mit Nanostrukturen ähneln diese Fimbrien, welchen eine wichtige Funktion bei Adhäsionsprozessen zugeschrieben wird. Allgemein haften Bakterien besser an rauen Oberflächen, da diese eine größere Kontaktfläche bieten und die Bakterien vor Scherkräften besser geschützt sind (33). Singh et al. berichten, dass eine steigende Rauigkeit von Oberflächen bis ca. 20 nm die bakterielle Anhaftung fördert, während bei noch größerer Rauigkeit (über 20 nm) die Menge an anhaftenden Bakterien wieder abnimmt (36).

Allerdings werden auch glatte Flächen bakteriell besiedelt, was verdeutlicht, dass neben der physikalischen Ultrastruktur weitere Faktoren von zentraler Bedeutung für die Adhäsion sind (33).

1.4. Mikrobieller Biofilm als Voraussetzung für die Entstehung von Karies, Parodontitis und Periimplantitis

Mikrobielle Biofilme bestehen vorwiegend aus mehr oder weniger dicht gepackten Mikroorganismen (37) einer einzelnen oder verschiedener Spezies (mono- oder multispezifischer Biofilm) (38). Die Mikroorganismen sind in eine extrazelluläre Matrix eingebettet, die die Bakterien teilweise aktiv selbst bilden (37). Bestandteile der extrazellulären Matrix sind u.a. Kohlenhydrate (z.B. Glukane und Fruktane), Proteine und Nukleinsäuren (39). Unter Plaque versteht man einen klinisch sichtbaren Biofilm, der sich als weicher, zäher Zahnbelag darstellt (4). Die Plaque beinhaltet zusätzlich diverse extrinsische Bestandteile, beispielsweise Epithelzellen der Mundschleimhaut und Nahrungsbestandteile (39).

Unmittelbar nach der Reinigung entsteht das sog. erworbene Pellikel auf der Zahnoberfläche, das unterschiedliche Proteine und Glykoproteine aus dem Speichel enthält. Anschließend binden sog. Frühbesiedler an das Pellikel (40), zu denen vorwiegend grampositive Bakterien aus der kommensalen oralen Bakterienflora gehören, insbesondere Streptokokken und Actinomyceten (41). Die Adhäsion ist, wie Pisarska et al. (40)

beschreiben, zunächst reversibel. Sobald die Bakterien mit der Sekretion von Biofilmmatrix beginnen, wird die Adhäsion an das Pellikel sowie untereinander stärker. Der Biofilm reift, wobei sich seine Zusammensetzung verändert. Spätbesiedelnde Bakterien können an Rezeptoren der Frühbesiedler binden und Koaggregate bilden. In die Gruppe der Spätbesiedler fallen u.a. *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) und *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Innerhalb des Biofilms bestehen sowohl symbiotische (z.B. gegenseitige Bereitstellung von Stoffwechselprodukten) als auch antibiotische Verhältnisse (z.B. Konkurrenz um Nahrung und Bindungsstellen) zwischen den Bakterien. Insgesamt überwiegen jedoch die Vorteile des Zusammenlebens im Biofilm für die Bakterien. Sie sind dadurch resistenter gegenüber mechanischen und biologischen Angriffen, beispielsweise durch die Mundhygiene oder Antibiotika. Ein supragingivaler Biofilm ist die Voraussetzung für die Entstehung von Karies, ein subgingivaler Biofilm für parodontale Erkrankungen (40).

1.5. Hinokitiol und Zink als potentiell antibakteriell wirksame Substanzen

1.5.1. Hinokitiol

1.5.1.1. Allgemeine Eigenschaften und Herkunft

Hinokitiol ist als ätherisches Öl ein Bestandteil der Zypressenart *Chamacyparis taiwanensis* (42, 43). Diese Verbindung ist auch unter dem Namen β -Thujaplicin bekannt (43) und hat die chemische Struktur eines phenolischen Monoterpens (44). Die zugehörige chemische Formel lautet $C_{10}H_{12}O_2$, das Molekulargewicht beträgt 164,2 Da (42). Hinokitiol ist schlecht wasserlöslich und lichtempfindlich (44).

1.5.1.2. Antibakterielle Wirkung

In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Hinokitiol neben einer dezidierten antibakteriellen Wirkung auch antivirale, antifungale und antientzündliche Effekte aufweist (44). Anders als bei Antibiotika entwickeln Bakterien gegenüber Hinokitiol keine Resistenzen (45). Dieses Öl entfaltet seine Wirkung deshalb unabhängig von einer potentiellen Antibiotikaresistenz bestimmter Keime (43). Auch antitumoröse Eigenschaften dieses Wirkstoffs sind beschrieben, beispielsweise von Shih et al. gegenüber Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms (46). Weiterhin scheint Hinokitiol positive Effekte bei der Behandlung von Halitosis (47) und Lichen planus (42) erzielen zu können.

Die antibakteriellen Wirkungen von Hinokitiol sind unabhängig von den Umgebungsbedingungen wie pH-Wert und Temperatur (42). Diese Wirkungen wurden in mehreren Studien auch an oralpathogenen Bakterien untersucht. Bei Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (minimum inhibitory concentration, MIC) weichen die Ergebnisse diverser Studien teilweise deutlich voneinander ab (42, 43, 46).

Aufgrund der antibakteriellen Wirksamkeit gegenüber u.a. oralpathogenen Mikroorganismen bei geringer Zytotoxizität in Bezug auf gingivale und pharyngeale Epithelzellen sollte Hinokitiol therapeutisch eingesetzt werden können (43).

1.5.1.3. Wirkmechanismus

Hinokitiol ähnelt in seiner Struktur einem Phenol. Letztere führen durch Schädigung der bakteriellen Zellmembran zur Zellyse (48). Die antibakterielle Wirkung von Hinokitiol beruht ebenfalls auf einer Interaktion des Stoffes mit der Zellmembran der Bakterien (48, 49).

Auf molekularer Ebene ist eine freie Hydroxylgruppe des Tropolonrings im Hinokitiolmolekül verantwortlich für die antibakterielle Wirkung. Morita et al. (48) stellten anhand von Untersuchungen mit *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* außerdem fest, dass Hinokitiol den bakteriellen Nährstofftransport und die Zellatmung behindert. Die Zellmembran, die maßgeblich für diese beiden Funktionen verantwortlich ist, scheint durch Hinokitiol beschädigt zu werden, obwohl bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen weder morphologische Veränderungen der Membran noch ein Austritt von Proteinen oder Nährstoffen aus den Zellen festgestellt werden konnte (48).

1.5.1.4. Unterschiede in der Wirksamkeit von Hinokitiol gegenüber gramnegativen bzw. grampositiven Bakterien

In der Literatur wurde mehrfach der Effekt beschrieben, dass Hinokitiol gegenüber grampositiven Bakterien eine stärkere antibakterielle Wirkung aufweist als gegenüber gramnegativen Bakterien (43, 48, 50, 51). Morita et al. (48) erklären diese Diskrepanz durch die äußere Membran gramnegativer Bakterien. Diese macht sie unempfindlicher gegenüber hydrophoben Substanzen wie Hinokitiol, da die äußere Membran den Eintritt von Hinokitiol in die Zelle behindert (48). Dieser Effekt wird auch in einer Studie zur Wirksamkeit von Hinokitiol u.a. auf oralpathogene Bakterien deutlich (43). Grampositive Bakterien wie *Streptococcus mutans* erwiesen sich dabei als empfindlicher gegenüber Hinokitiol als gramnegative orale Pathogene wie *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* und *Fusobacterium nucleatum* (43). Eine Untersuchung von Wang et al. (42) hingegen, die sich mit dem Effekt von Hinokitiol auf *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans*, MRSA und *Escherichia coli* befasst, stellt keinen Unterschied bezüglich der Wirksamkeit von Hinokitiol gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterienstämmen fest. Im Agardiffusionstest der Arbeitsgruppe um Wang reagierte *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* am empfindlichsten auf Hinokitiol (42).

1.5.1.5. Lichtempfindlichkeit

Coombs et al. (52) fanden heraus, dass Hinokitiol seine antibakterielle Wirksamkeit verliert, wenn es lichtexponiert gelagert wird. Sie testeten die antibakterielle Wirkung von Hinokitiol unter verschiedenen Lichtbedingungen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer: Die Hemmhofgröße – und damit die antibakterielle Wirkung – nahm bei UV-Licht sowie bei Standardlaborbeleuchtung deutlich ab, während sie bei abgedunkeltem Labor und der im Dunklen aufbewahrten Kontrollgruppe konstant blieb. Deshalb wird Hinokitiol in lichtundurchlässigen Glasbehältern aufbewahrt und verarbeitet (52). Lagerbehälter aus Glas sind auch deshalb vorteilhaft, weil Hinokitiol an verschiedenen Kunststoffen adhärert (43).

1.5.1.6. Zytotoxizität

Hiyoshi et al. (53) berichten von einer geringen Zytotoxizität von Hinokitiol gegenüber humanen Zellen. Bei humanen Gingivafibroblasten zeigte Hinokitiol in Konzentrationen von bis zu 500 µg/ml keinerlei Zytotoxizität, gegenüber Gingivaepithelzellen nahm die Zellviabilität ab einer Konzentration von 500 µg/ml Hinokitiol signifikant ab. Der Grund für die höhere Empfindlichkeit der Gingivaepithelzellen gegenüber Hinokitiol besteht laut Hiyoshi et al. ggf. darin, dass es sich bei den in den Versuchen verwendeten Gingivaepithelzellen um Tumorzellen handelte (53). Auf Tumorzellen hat Hinokitiol nach Beobachtungen von Shih et al. eine höhere zytotoxische Wirkung als auf normale humane Zellen wie orale Keratinozyten (46).

1.5.2. Zink

1.5.2.1. Bedeutung von Zink für Menschen und Bakterien

Zink ist das zweithäufigste Spurenelement in Lebewesen (54-56). Es ist für die Körperfunktion aller Lebewesen essentiell (55, 57, 58). Es kommt im gesamten menschlichen Körper vor (ca. 2 Gramm) (57). Der Großteil an Zink (mehr als 95 %) befindet sich intrazellulär, lediglich 2 % sind im Serum lokalisiert, über das das Spurenelement im Körper verteilt wird (59).

Zink ist u.a. wichtig für Wachstum und Entwicklung und ist Bestandteil diverser Proteine und Enzyme. Es fördert das Knochenwachstum und die Knochenmineralisation und beeinflusst die Osteoklastenaktivität (57). Xia et al. (55) beschreiben, dass Zink außerdem an der DNA-Replikation und der Transkription beteiligt ist und eine Rolle bei der Apoptose und Signaltransduktion spielt. Ein systemischer Zinkmangel kann ein verzögertes Wachstum bewirken, das Immunsystem beeinträchtigen und verschiedene weitere pathologische Veränderungen im Körper hervorrufen. Auch für Bakterien ist Zink von großer Bedeutung. Es wird z.B. zur DNA-Reparatur, für enzymatische Reaktionen und bei oxidativem Stress benötigt und ist wichtig für die Regulation physiologischer Prozesse (55). Es ist außerdem in ca. 5-6 % der bakteriellen Proteine enthalten – beim Menschen in etwa 10 %. (58).

Zink vermittelt darüber hinaus eine immunologische Wirkung im Rahmen der sog. *nutritional immunity* – sozusagen einer nahrungsvermittelten Immunität, wie Xia et al. (55) berichten. Bei einer Infektion kann der Wirt die Zinkkonzentration lokal reduzieren und somit das Wachstum und die Virulenz der Pathogene begrenzen. Die Bakterien versuchen mittels Zink-Transportern, die die Aufnahme und den Export von Zink in die Zelle bzw. aus der Zelle vermitteln, die Zinkkonzentration in der Zelle konstant zu halten. Die Transporter werden je nach umgebender Zinkkonzentration vermehrt bzw. vermindert exprimiert. Auch die Expression von Virulenzfaktoren und die Pathogenität von Bakterien kann durch Zink-Transporter beeinflusst werden. Diese könnten daher Ziel für neue Medikamente oder Impfungen sein. Allerdings kann auch ein Zinküberschuss der Infektionsabwehr dienen, da zu viel Zink toxisch auf Bakterien wirken kann (55). Zink wird dann stark an die Zelloberfläche adsorbiert und durchdringt die Zellmembran. Wenn diese rupturiert, entweicht Zytoplasma

aus der Zelle, was zum Zelltod und zur Entstehung von Sauerstoffradikalen führt. In nicht bakteriziden Konzentrationen kann Zink die Biofilmbildung bei vielen Bakterienspezies verhindern (60).

1.5.2.2. Zink und orale Gesundheit

In der Mundhöhle kommt Zink u.a. im Speichel, der Mukosa und den Zähnen vor, wie Lynch (57) beschreibt. Bereits vor dem Zahndurchbruch ist Zink im Schmelz vorhanden. Nach Eruption eines Zahnes ist die Konzentration auf der Zahnoberfläche zusätzlich erhöht. Zink soll Plaque, Halitosis und Zahnstein bekämpfen und ist daher in einigen Mundpflegeprodukten enthalten. Es weist eine hohe Substantivität im Mund auf. Mehrere Stunden nach Applikation sind erhöhte Zinkkonzentrationen in Speichel und Plaque nachweisbar (57).

Bezüglich der Wirksamkeit von Zinkchlorid gegenüber oralen Pathogenen liegen teilweise widersprüchliche Forschungsergebnisse vor. Überwiegend wird in der einschlägigen Literatur von einer intensiven antibakteriellen Wirkung des Zinks berichtet. Kang et al. stellten fest, dass Zinkchlorid das Wachstum einiger oralpathogener Bakterien – darunter auch *Streptococcus mutans* und *Porphyromonas gingivalis* – hemmt (61). Der zugrunde liegende Wirkmechanismus beruht auf der Hemmung der Glykolyse der Mikroorganismen (62). Auch Uwitonze et al. (59) berichten, dass eine erhöhte Zinkkonzentration das Wachstum von Bakterien – insbesondere von *Streptococcus mutans* – hemmt, indem es auf glykolytische Enzyme wirkt. Weiterhin hat es einen inhibierenden Effekt auf die Säureproduktion in der Plaque und vermindert dadurch die Plaquebildung. Auch für die Prävention der Gingivitis soll Zink nützlich sein, da es wirksam gegenüber *Fusobacterium nucleatum* und *Prevotella intermedia* ist. Zusätzlich ist Zink laut Uwitonze et al. in der Lage Proteasen zu hemmen, die von *Porphyromonas gingivalis* produziert werden (59). Suzuki et al. (63) beschreiben ebenfalls antimikrobielle Effekte von Zink gegenüber oralpathogenen Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Fusobacterium nucleatum*. Weiterhin bindet Zinkchlorid flüchtige Schwefelwasserstoffverbindungen. Bakterien – insbesondere strikte Anaerobier – verstoffwechseln schwefelhaltige Aminosäuren, die in oralem Debris enthalten sind, zu Schwefelwasserstoff, der eng mit Halitosis verknüpft ist. Beide Mechanismen, der antimikrobielle Effekt von Zink und die direkte hemmende Wirkung auf die Verflüchtigung von Schwefelwasserstoff, bedingen die in der Studie untersuchte positive Wirkung von Zink und anderen Metallionen auf die Halitosis (63).

Spacciapoli et al. (64) hingegen beschreiben Zinkchlorid als unwirksam gegenüber parodontalpathogenen Bakterien, insbesondere *Porphyromonas gingivalis*. Als möglicher Grund hierfür wird die im Vergleich zu anderen antibakteriell wirksameren Metallionen geringere Affinität von Zinkchlorid zu Thiolgruppen diskutiert (64).

1.5.3. Synergismus zwischen Zink und Hinokitiol

Der antibakterielle Effekt von Hinokitiol kann laut Arima et al. durch Kombination mit Zink verstärkt werden (65). Hoang et al. sowie Krenn et al. beschreiben die Wirkung von

Hinokitiol als Ionophor (66, 67). Ionophore sind lipophile Stoffe, die den Transport nicht fettlöslicher Substanzen durch die Zellmembran vermitteln. Hinokitiol kann als Zink-Ionophor die Zinkaufnahme in Zellen stimulieren. Hoang et al. beschreiben in diesem Zusammenhang einen Anstieg von intrazellulärem Zink innerhalb weniger Minuten bei Anwesenheit von Hinokitiol (66).

1.5.4. Therapieansätze mit Zink im oralen Milieu

Zinkbasierte Salze wie Zinkchlorid sind in vielen Mundhygieneprodukten enthalten, um die Plaque- und Zahnsteinbildung zu hemmen (57, 59, 68) und damit Plaque-assoziierten Erkrankungen wie Parodontitis und Karies vorzubeugen (59). Nach einem Review von Uwitonze et al. sind Zahnpasten, die zusätzlich zu Fluorid Zink enthalten, wirkungsvoller gegen Demineralisierungsprozesse des Dentins und fördern die Remineralisierung stärker als Zahncremes ohne Zink (59). Weiterhin hemmen Zinksalze die Bildung von flüchtigen Schwefelverbindungen, wodurch sie in der Lage sind Mundgeruch zu reduzieren (57, 59, 68). Auch zur Prävention der oralen Mukositis bei Chemo-/ Radiotherapie und bei der Behandlung von Aphten kann Zink zum Einsatz kommen. Bei Gabe von Zinkpräparaten ist zu beachten, dass Eisensupplementierung die Zinkaufnahme negativ beeinflussen kann (59).

2. Ziele der Studie

In der vorliegenden Studie sollten die antibakteriellen Wirkungen verschiedener Konzentrationen von Zinkchlorid, Hinokitiol und der Kombination der beiden Stoffe gegen ausgewählte kariogene (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*) und parodontalpathogene Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*) untersucht werden.

Folgende Nullhypothesen wurden überprüft:

- Nullhypothese 1: Hinokitiol, Zink und deren Kombination sind nicht antibakteriell wirksam gegen ausgewählte kariogene Bakterien.
- Nullhypothese 2: Hinokitiol, Zink und deren Kombination sind nicht antibakteriell wirksam gegen ausgewählte parodontalpathogene Bakterien.
- Nullhypothese 3: Mit Hinokitiol ist keine Reinigung von Implantatoberflächen möglich, die mit Speichel und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kontaminiert wurden.
- Nullhypothese 4: Es besteht kein Unterschied zwischen der antibakteriellen Wirksamkeit von Hinokitiol und Chlorhexidin im Rahmen der Reinigung der Implantatoberflächen.
- Nullhypothese 5: Eine mechanische Reinigung der Implantate mit den getesteten Wirkstoffen ist nicht effektiver als das Einbringen der Prüfkörper in die Substanzen.

3. Material und Methoden

3.1. Verwendete Materialien

Eine Tabelle, in der alle verwendeten Materialien unter Angabe von Namen, Typ und Hersteller aufgelistet sind, befindet sich im Anhang (Kapitel 12.1).

3.2. Methoden

3.2.1. Agardiffusionstests

3.2.1.1. Durchführung der Agardiffusionstests

Die Agardiffusionstests wurden weitgehend nach dem modifizierten Protokoll „*Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method*“ (69) durchgeführt.

Als kario gene Bakterien wurden *Streptococcus mutans* (DSMZ 20523) und *Actinomyces viscosus* (DSMZ 43327) verwendet, als Vertreter der parodontalpathogenen Bakterien wurden *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (DSMZ 11123), *Fusobacterium nucleatum* (DSMZ 19507) und *Porphyromonas gingivalis* (DSMZ 20709) für die Tests ausgewählt.

Die Bakterien wurden bei -80° Celsius in sterilen Kryoröhrchen (CRYO.S, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) im Gefrierschrank gelagert. Für die Hauptversuche wurden jeweils frisch aufgetaute Bakterien verwendet. Diese wurden auf den entsprechenden Nährmedien angeimpft und inkubiert. Für *Streptococcus mutans* wurde Trypticase-Soy-Yeast-Extract-Agar hergestellt, für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Actinomyces viscosus* Müller-Hinton-Agar mit Pferdeblut (Oxoid, Wesel, Deutschland) verwendet. Diese drei Bakterienarten wurden aerob inkubiert, wohingegen *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* anaerob auf Schaedler-Agar (BD, Heidelberg, Deutschland) angezüchtet wurden (Tabelle 2). Anschließend wurden mit einem sterilen Wattestäbchen (Raucotupf, Lohmann & Rauscher, Neuwied, Deutschland) mehrere koloniebildende Einheiten (KBE) von einer Agarplatte abgenommen und in steriler, 0,9 %iger Kochsalzlösung (Verwendung von Natriumchlorid vom Hersteller Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) suspendiert. Der Bakteriengehalt der Lösung wurde entsprechend des McFarland Standards kalibriert: McFarland 0,5 bei aeroben Bakterien, McFarland 1,0 bei Anaerobiern. Hierfür wurde die optische Dichte einer Standardprobe (McFarland Equivalence Turbidity Standard 0,5, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland bzw. McFarland Equivalence Turbidity Standard 1,0, Remel, Lenexa, Kansas, USA) zuvor bei 600 nm (OD 600) mittels Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Die OD 600 des McFarland Standards 0,5 beträgt 0,179, die des McFarland Standards 1,0 entspricht 0,263. Die Bakteriendichte der Versuchsproben wurde nachfolgend an den vorgesehenen McFarland Standard adjustiert. Der Toleranzbereich wurde auf +/- 0,01 festgelegt. Anschließend wurden Agarplatten mit der Suspension beimpft. Hierfür wurde ein steriles Wattestäbchen in die Bakterien-Kochsalzlösung eingetaucht. Bei gramnegativen Bakterien wurde es entsprechend des Protokolls des *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) beim Herausziehen leicht am Rand des Falcons ausgedrückt,

um ein zu starkes Bakterienwachstum zu vermeiden. Dann wurde pro Wattestäbchen je eine Agarplatte beimpft, indem die Suspension mit dem Wattestäbchen in drei Richtungen ausgestrichen wurde. Das Ausstreichen erfolgte von einer Seite der Platte zur gegenüberliegenden, wobei die Platte zwei Mal um jeweils 60 Grad rotiert wurde. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst keine unbeimpften Spalträume auf der Platte entstehen, damit ein gleichmäßiger Bakterienrasen wachsen kann. Anschließend wurden die Testplättchen mit sterilen Pinzetten auf die beimpften Agarplatten aufgebracht. Es wurden sowohl vom Hersteller mit Wirkstoff versehene Testplättchen verwendet (Metronidazol 5 µg, Amoxicillin 10 µg, Penicillin-G 1 unit, Hersteller für alle Oxoid, Wesel, Deutschland) als auch Testplättchen, denen manuell Wirkstoff zugefügt wurde (Absorbent thick paper, Munktell Filtrak, Bärenstein, Deutschland). Letztere wurden mit den Wirkstoffen β-Thujaplicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), Zinkchlorid (TCI, Eschborn, Deutschland), Mundspüllösung (Dr ZinX Mouth Sanitiser, Astivita Limited, Queensland, Australien) und Metronidazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) versehen. Hinokitiol und Zinkchlorid wurden hierbei in den Konzentrationen 20mM, 10mM, 5mM, 2500µM, 500µM, 100µM und 20µM verwendet, wobei die Verdünnung mit Flüssigmedium erfolgte (Tabelle 1). Die Mundspüllösung wurde unverdünnt, in zehnprozentiger sowie in einprozentiger Lösung getestet (Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung). Die Plättchen wurden mittels Pinzette leicht am Agar festgedrückt, um ein Abfallen bei Inkubation der Platten mit dem Agar nach oben zu verhindern. Die beschriebenen Arbeitsschritte ab Herstellung des Inokulums erfolgten unter Beachtung der im EUCAST-Protokoll beschriebenen 15-15-15-Minuten-Regel: Das Inokulum soll innerhalb von 15 Minuten auf die Agarplatten aufgetragen werden, dann sollen vor Ablauf weiterer 15 Minuten alle Testplättchen aufgebracht werden und anschließend innerhalb weiterer 15 Minuten die Inkubation der Platten erfolgen. Für Agardiffusionstests mit *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Actinomyces viscosus* wurde Müller-Hinton-Agar mit Pferdeblut (Oxoid, Wesel, Deutschland) verwendet, für *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* Fastidious Anaerobe Agar (Oxoid, Wesel, Deutschland). Platten mit *Streptococcus mutans* wurden 18 +/- 2 Stunden inkubiert, Platten mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 20 Stunden, mit *Actinomyces viscosus* 36 Stunden, mit *Fusobacterium nucleatum* 48 Stunden und mit *Porphyromonas gingivalis* 5 Tage (Tabelle 3). Nach Inkubation wurden die Hemmhofdurchmesser auf der Oberseite der Platten mit einem Lineal auf ganze Millimeter genau gemessen. Der Durchmesser eines Testplättchens (6 mm) wird nicht vom Hemmhofdurchmesser abgezogen. Ein Hemmhof von beispielsweise 8 mm entspricht also einem Ring von 2 mm Breite um das Plättchen, in dem kein Bakterienwachstum stattfindet.

3.2.1.2. Herstellung der Filterpapierplättchen mit Hinokitiol und Zinkchlorid

Zuerst wurde die Saugfähigkeit der Filterpapierplättchen mit Wasser getestet. Hierzu wurde ein Plättchen mit einer Feinwaage (Adam Equipment, Felde, Deutschland) gewogen (8,9 mg), dann eine Minute in Wasser eingebracht, abgeschüttelt und erneut gewogen (35,1 mg). Die

Differenz der beiden Werte (26,2 mg) beschreibt eine Wasseraufnahme des Plättchens von 26,2 µl (1 mg entspricht 1 µl). Zur Überprüfung des Verfahrens wurde ein weiteres Plättchen gewogen (6,6 mg), um anschließend 20 µl Wasser mit einer Pipette auf das Plättchen zu geben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Pipettenspitze das Plättchen leicht berührt. Nach erneutem Wiegen (26,4 mg) wurde eine Wasseraufnahme von 19,8 µl berechnet – das Plättchen konnte die zugeführte Flüssigkeit somit fast vollständig aufnehmen. Weiterhin wurde anhand eines weiteren Filterpapierplättchens, auf das 20 µl Wasser pipettiert wurden, überprüft, ob dieses nach 45 Minuten Trocknen im Wärmeschrank (Jouan Innovens, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) weitere 20 µl Wasser aufnehmen kann. Das war jedoch nicht der Fall. Demzufolge wurde festgelegt, die Filterpapierplättchen für die folgenden Versuche mit jeweils 20 µl Flüssigkeit zu versehen. Vor Benutzung wurden die Plättchen zwei Stunden lang im Ofen bei 160° Celsius erhitzt.

Aus Hinokitiol und Zinkchlorid wurden jeweils 20 mM Stammlösungen hergestellt (für die Agardiffusionstests mit *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* aufgrund geringerer Empfindlichkeit 40 mM Hk-Stammlösung). Für die 20 mM Lösungen wurden je 33,0 mg Hinokitiol bzw. 27,3 mg Zinkchlorid in 10 ml DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter Vortexen (Vortex-Mischer, neoLab, Heidelberg, Deutschland) gelöst. Diese Lösungen sowie die fertig zubereitete Mundspüllösung (Dr ZinX Mouth Sanitiser, Astivita Limited, Queensland, Australien) und die 0,9 %ige Natriumchloridlösung wurden unter einer Sicherheitswerkbank (Hera safe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sterilfiltriert (Verwendung von Sterilfiltern mit Porengröße von 0,2 µm, Sterile Syringe Filter, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Daraufhin wurden mehrere Verdünnungen der einzelnen Lösungen angefertigt, wobei Hinokitiol und Zinkchlorid mit Flüssigmedium (FM), die Zubereitung der Mundspüllösung mit 0,9 %iger Natriumchloridlösung verdünnt wurden. Als Negativkontrolle wurde DMSO verwendet, angepasst an die im jeweiligen Versuch verwendete höchste Wirkstoffkonzentration von Hinokitiol (Tabelle 1). Im Anschluss wurden die Filterpapierplättchen mittels steriler Pinzette in einer Wellschale (Cellstar, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) vorgelegt, um sie mit den verschiedenen Lösungen imprägnieren zu können. Dazu wurden je 20 µl einer Lösung auf ein Plättchen pipettiert. Die Pipettenspitze berührte dabei das Plättchen leicht. Da Hinokitiol lichtempfindlich ist, wurde vollständig lichtgeschützt gearbeitet. Alle Falcons, Eppendorfgefäße oder Spritzen, die Hinokitiol beinhalteten, wurden mit Alufolie umwickelt. Auch die Wellschale mit den Filterpapierplättchen wurde bis zur Verwendung in Alufolie eingepackt. Außerdem wurde kein Licht im Labor eingeschaltet.

Als Positivkontrolle wurden gegen die jeweiligen Bakterienstämme gut wirksame Antibiotika ausgewählt: Penicillin G (1 unit) für *Streptococcus mutans* (70) und *Actinomyces viscosus* (71), Amoxicillin (10 µg) für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (72) und Metronidazol für die anaeroben Bakterien *Fusobacterium nucleatum* (5 µg) (73) und *Porphyromonas gingivalis* (0,25 µg) (74). Die Gewichtsangaben beschreiben die in einem

Filterpapierplättchen enthaltene Menge an Antibiotikum. Mit Ausnahme der Plättchen für *Porphyromonas gingivalis* wurden kommerziell erhältliche Plättchen verwendet. Für *Porphyromonas gingivalis* wurden Plättchen mit geringerer Konzentration an Metronidazol manuell hergestellt. Hierfür wurde Metronidazol-Pulver (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) verwendet. Zuerst wurde eine 20 mM Stammlösung hergestellt (17,1 mg Metronidazol gelöst in 5 ml destilliertem Wasser), welche anschließend auf eine 146 µM Lösung verdünnt wurde (14,6 µl Stammlösung plus 1,985 ml destilliertes Wasser), sodass in jedem Plättchen 0,25 µg enthalten waren, wenn 20 µl der Lösung eingebracht wurden.

Tabelle 1: Verdünnungen der 20mM bzw. 40mM Hinokitiol-Stammlösungen für die Agardiffusionstests

Konzentrationen [µM]	Hinokitiol-Stammlösung, 20 mM [µl]	Flüssigmedium [µl]
2500	125	875
500	5	195
100	5	995
20	2	1998
Konzentrationen [mM]	Hinokitiol-Stammlösung, 40 mM [µl]	Flüssigmedium [µl]
20	500	500
10	250	750
5	125	875

3.2.1.3. Herstellung der Medien

3.2.1.3.1. Trypticase soy yeast extract medium (TSYEM)

Zur Herstellung von einem Liter TSYEM wurden 30 g Trypticase soy broth (Oxoid, Wesel, Deutschland) und 3 g Hefeextrakt (BBL™ Yeast Extract, BD, Heidelberg, Deutschland) in 500 ml destilliertem Wasser unter Erwärmung auf dem Magnetrührgerät (Denley Magmix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) vermischt. Nach vollständiger Auflösung der Pulver wurden weitere 500 ml destilliertes Wasser zugegeben. Anschließend wurde mittels pH-Meter (827 pH lab, Metrohm, Herisau, Schweiz) der pH-Wert gemessen. Dieser soll zwischen 7,0 und 7,2 liegen (75). Alle Flüssigmedien wurden jeweils bei 121° Celsius 15 Minuten lang autoklaviert und nach Abkühlen im Kühlschrank bei 4° Celsius gelagert.

3.2.1.3.2. Trypticase soy yeast extract agar (TSYEA)

TSYEA wurde bis auf die Zugabe von 15 g Agar (Agar Bacteriological (Agar No. 1), Oxoid, Wesel, Deutschland) analog zum TSYEM hergestellt. Nach dem Abkühlen der durch das unmittelbar vorangehende Autoklavieren erhitzten Lösung auf ca. 50° Celsius wurden unter der Sicherheitswerkbank Agarplatten gegossen. Hierfür wurden sterile Petrischalen (Nunclon Delta Surface, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. In jede Platte wurden ca. 25 ml TSYEA geschüttet. Zum Abkühlen wurden die Platten gestapelt

gelagert, um die Kondenswasserbildung möglichst gering zu halten. Vollständig abgekühlt wurden die Platten luftdicht in Plastikbeutel verpackt und im Kühlschrank mit der Unterseite nach oben gelagert, damit kein Kondenswasser auf den Agar tropft.

3.2.1.3.3. Brain heart infusion (BHI)

Gemäß Herstellerangabe wurden pro Liter destilliertem Wasser 37 g BHI-Pulver (Brain Heart Infusion Broth, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) verwendet. Die Herstellung erfolgte ansonsten analog zum TSYEM.

3.2.1.3.4. Brain heart infusion mit Hefeextrakt

Das BHI-Medium wurde pro Liter mit 5 g Hefeextrakt ergänzt, um das Wachstum von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf den Implantaten zu fördern.

3.2.1.3.5. Thioglycolate broth (TB)

Für die Herstellung von einem Liter Thioglycolate broth nach Herstellerangabe wurden 30 g Thioglycolate broth-Pulver (Thioglykolat Medium, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter Rühren, Erwärmen und Schütteln gelöst. Anschließend wurde das Medium vor dem Autoklavieren eine Minute lang in der Mikrowelle aufgeköcht. Gelagert wurde es luftdicht verschlossen im Kühlschrank.

3.2.1.4. Kryokonservierung von Bakterien

Zur Kryokonservierung wurden je 500 µl einer Übernachtskultur des jeweiligen Bakteriums mit 500 µl 30 %iger Glycerollösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in ein Kryoröhrchen gegeben und nach Vortexen bei -80° Celsius eingefroren. Die 30%ige Glycerollösung wurde durch Vermischen von 30 ml Glycerol und 70 ml destilliertem Wasser hergestellt. Die Lösung wurde anschließend bei 121° Celsius 15 Minuten lang autoklaviert.

Das Einfrieren von Anaerobiern erfolgte analog. Allerdings wurden die anaeroben Bakterien zur Kryokonservierung mittels steriler Impföse (Einwegimpfösen, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) von einer Agarplatte abgenommen und in eine Suspension aus Glycerollösung und zu den jeweiligen Bakterien passendem Flüssigmedium (Verhältnis 1:1) eingebracht. Alternativ wurde die Cryobank (Cryobank gemischt (4x20), Mast Group Ltd., Bootle, UK) verwendet.

3.2.1.5. Bakterienkultivierung

Die aerobe Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 37° Celsius und einem CO₂-Gehalt von 5,8 % (Steri-Cult CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die Platten bzw. Falcons mit anaeroben Bakterien wurden in luftdicht verschließbaren Inkubationsbehältern mit GasPaks (Anaerobe Container System, BD, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Für die verwendeten Behälter müssen laut Herstellerangabe jeweils 3 GasPak-Beutel verwendet werden, um ein ausreichend anaerobes Milieu zu erzeugen, welches mit Hilfe von Indikatorstreifen (Anaerobic indicator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) kontrolliert wurde. Die Inkubation erfolgte in einem 37°

Celsius warmen Wärmeschrank (Jouan Innovens, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; Tabelle 2 und 3).

Tabelle 2: Zur Bakterienkultivierung verwendete Nährmedien und Inkubationsmodalitäten

Bakterium	Flüssigmedium	Festes Medium	Inkubationsdauer	Aerobe/ anaerobe Inkubation
S. mutans	TSYEM	TSYEA	48 h	aerob
A. actinomycetemcomitans	BHI	Müller-Hinton mit Pferdeblut (MH)	48 h	aerob
A. viscosus	TSYEM	Müller-Hinton mit Pferdeblut	48 h	aerob
F. nucleatum	TB	Schaedler-Agar	48 h	anaerob
P. gingivalis	TB	Schaedler-Agar	5 d	anaerob

Tabelle 3: Für die Agardiffusionstests verwendete Nährmedien und Inkubationszeiten der verschiedenen Bakterien bis zum Ablesen der Hemmhofgrößen

Bakterium	Medium Agardiffusionstest	Inkubationsdauer bis Ablesen der Hemmhöfe
S. mutans	MH	18 +/-2 h
A. actinomycetemcomitans	MH	20 h
A. viscosus	MH	36 h
F. nucleatum	FAA	48 h
P. gingivalis	FAA	5 d

3.2.1.6. Wachstumskurven

Für die aerob inkubierten Bakterienstämme wurden Wachstumskurven angefertigt. Dazu wurden drei Verdünnungen einer flüssigen Übernachtskultur des jeweiligen Bakteriums angelegt. In separaten Falcons wurden Mengen von 1,8 ml, 3,8 ml oder 7,8 ml Flüssigmedium eingebracht. In die drei Falcons wurden anschließend jeweils 200 µl Flüssig-Übernachtskultur des jeweiligen Bakteriums pipettiert. Die Suspensionen wurden mit Hilfe eines Vortex-Geräts gemischt. Dann wurden diese sowie reines Nährmedium ohne Bakterieninokulum als Blank in eine 48-Well-Platte mit einem Arbeitsvolumen von 1 ml pipettiert (n=2). Danach wurde vom Zeitpunkt $t_0=0$ h (unmittelbar nach Anlegen des

Versuchs) alle zwei Stunden bis zum Zeitpunkt $t_6=12$ h die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem photometrischen Microplatereader (Infinite Microplate-Reader, Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Es erfolgten zwei weitere Messungen zu den Zeitpunkten $t_7 = 24$ h und $t_8 = 48$ h sowie im Fall von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Actinomyces viscosus* zusätzlich zu den Zeitpunkten $t_9 = 72$ h bzw. t_9 und $t_{10} = 96$ h.

3.2.2. In-vitro-(De-)Kontamination von Titanimplantaten

3.2.2.1. Kontamination der Implantate mit Bakterien

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden 3i T3-Implantate mit DCD-Oberfläche („Discrete Crystalline Deposition“) vom Hersteller Biomet (Warsaw, Indiana, USA) verwendet. DCD bezeichnet eine Auflagerung von Nanopartikeln aus Calciumphosphat. Diese sollen laut Biomet die Verbindung zwischen Knochen und Implantat fördern und sind Bestandteil der Sub-Mikro-Topografie. Letztere weist laut Hersteller Vorsprünge zwischen 0,01 und 0,1 Mikrometer auf und ist neben der Fein-Mikro-Topografie sowohl in die Oberfläche der Region des Implantathalses als auch der Gewinderegion integriert. Die Fein-Mikro-Topografie beschreibt eine zweifach säuregeätzte Oberfläche mit Vorsprüngen im Bereich von 1-3 Mikrometern. Diese Oberflächenstruktur fördert die Osteokonduktion und beeinflusst die Thrombozytenaktivität. In der Gewinderegion des Implantats weist die Oberfläche zusätzlich eine Grob-Mikro-Topografie mit Vorsprüngen in einer Dimension von über 10 Mikrometern auf. Insgesamt setzt sich die Implantatoberfläche also aus drei verschiedenen Ultrastrukturen zusammen. Die Fein- und die Sub-Mikro-Topografie befinden sich sowohl im cervikalen Bereich des Implantats als auch in der Gewinderegion, die Grob-Mikro-Topografie ist ausschließlich in der Gewinderegion vorhanden. Der Sa-Wert, der die durchschnittliche Rauigkeit einer Oberfläche beschreibt, beträgt in der cervikalen Region des Implantats ca. $0,5 \mu\text{m}$, im Gewindebereich ca. $1,4 \mu\text{m}$ (76).

Um zu untersuchen, ob mittels Hinokitiol eine Reinigung von Implantatoberflächen, die mit oralen Bakterien besiedelt sind, möglich ist, mussten diese zunächst in vitro mit Bakterien kontaminiert werden. Hierfür wurden die Implantate zunächst in Speichel eingebracht. Die Speichelprobe wurde vor jedem Versuch frisch von derselben Person gesammelt. Die Implantate wurden einzeln in Falcons mit jeweils 5 ml (Versuch zur Visualisierung der Reinigung der Implantate mittels Rasterelektronenmikroskopie) oder 3 ml (Versuch zur Quantifizierung der auf den Implantaten verbliebenen Bakterien mittels BacTiter-Glo) Speichel gelegt und aerob bei 37° Celsius und einem CO_2 -Gehalt von 5,8 % eine Woche lang inkubiert (Steri-Cult CO_2 Incubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Anschließend wurden die Implantate in BHI mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* überführt und drei Wochen unter gleichen Bedingungen inkubiert. Ein Falcon enthielt jeweils 9 ml Medium und 1 ml Suspension aus Kochsalzlösung und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kalibriert entsprechend McFarland 0,5.

3.2.2.2. *Reinigungsmethoden*

Nach Kontamination der Implantate wurde untersucht, ob eine Reinigung mit Hinokitiol (20 mM) möglich ist. In weiteren Versuchsgruppen wurden die Implantate mit Chlorhexidin 0,2 % (Verdünnung von Speikosept (Chlorhexidin 2 %), Dr. Speier GmbH, Bielefeld, Deutschland) oder Natriumchloridlösung 0,9 % gereinigt (Tabelle 4). Als Negativkontrollen dienten Implantate ohne Kontamination, die in Nährlösung inkubiert wurden (BHI), als Positivkontrollen Implantate, die nicht dekontaminiert wurden. Zur Reinigung der Implantate mit Hinokitiol, Chlorhexidin bzw. Kochsalzlösung kamen jeweils zwei verschiedene Methoden zum Einsatz: Ein Teil der Implantate wurde zwei Stunden lang auf einem Schwenker (Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland) in 9 ml der jeweiligen Substanz eingebracht. Die Oberflächen der Proben des zweiten Teils wurden 60 Sekunden lang mit einem sterilen Schaumstoffpellet (Pele Tim No. 4, Voco, Cuxhaven, Deutschland), das in der jeweiligen Substanz getränkt worden war, manuell von allen Seiten bearbeitet. Für das Anfertigen der Bilder am Rasterelektronenmikroskop (Supra 55VP, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bestand jede Versuchsgruppe aus je einem Implantat, für die quantitative Untersuchung der antibakteriellen Wirkungen betrug n=4 (Ausnahme: Negativkontrolle: n=2).

3.2.2.3. *Visualisierung der erfolgten Reinigung mittels Rasterelektronenmikroskopie*

Um rasterelektronenmikroskopische Bilder anfertigen zu können, mussten die Prüfkörper nach Inkubation zunächst fixiert und dehydriert werden. Zur Fixierung der Implantate wurden diese zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (Phosphate-buffered saline, PBS, gibco, Paisley, Scotland) gewaschen. Anschließend wurden die Prüfkörper über Nacht einzeln in Wells – gefüllt mit zweiprozentiger Glutardialdehydlösung – im Kühlschrank bei 4° Celsius gelagert. Die zweiprozentige Glutardialdehydlösung wurde durch Verdünnung einer fünfzigprozentigen Glutardialdehydlösung (Glutardialdehyd 50 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit destilliertem Wasser hergestellt. Nach der Fixierung wurden die Implantate erneut zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe: Die Prüfkörper wurden in einer Wellschale jeweils 15 Minuten in Ethanollösungen (Ethanol 99%, vollvergällt, Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland) folgender Konzentrationen eingebracht: 50 %, 75 %, 85 %, 90 % und 99 % und kontinuierlich im Kühlschrank bei 4° Celsius gelagert. Danach wurden die Prüfkörper vor Anfertigung der REM-Bilder mindestens 24 Stunden luftgetrocknet. Unmittelbar vor dem Einschleusen in das REM wurden die Implantate in einer mit Argon gefluteten Kammer mit Goldpalladium gesputtert. Die Schichtdicke betrug 30 nm. Aufnahmen wurden in 30-, 2500-, 5000- und 10000-facher Vergrößerung angefertigt. Mit Ausnahme der 30-fach vergrößerten Bilder wurden jeweils ein Foto im koronalen Anteil eines Implantats und eines im Gewindeanteil angefertigt, da sich die Oberflächenstrukturen in diesen Bereichen voneinander unterscheiden.

3.2.2.4. *Der BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay als ATP-Biolumineszenz-Assay zur Bakterienquantifizierung*

Der BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA) ist ein ATP-Biolumineszenz-Assay. Mit Hilfe dieses Assays kann laut Herstellerangaben durch ATP-Quantifizierung die Anzahl an Bakterien, Hefen oder Pilzen in einer 1:1-Mischung aus Flüssigkultur und Lyse-Reagenz gemessen werden. Das Zellaufschluss-Reagenz besitzt die Eigenschaften einer thermostabilen Luciferase und dient dazu, das ATP aus den Zellen zu extrahieren. Aufgrund der hohen Sensitivität des Assays liegt die Nachweisgrenze bei 10 Zellen (77).

Das zugrunde liegende biologische Prinzip der Biolumineszenz beruht auf dem Naturstoff Luciferin, der durch das Enzym Luciferase – eine Monooxygenase – aktiviert wird und bei Rückkehr in einen inaktiven Zustand Energie in Form von Licht freisetzt (78). Bei ATP-Biolumineszenz-Assays wird die vorhandene Menge an ATP gemessen. ATP fungiert im Rahmen des Assays als Indikator für metabolisch aktive Zellen und ist in vitalen Zellen in relativ konstanter Menge vorhanden, wie Balouiri et al. (79) beschreiben. In Anwesenheit von ATP wird Luciferin durch die Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt, das Licht emittiert. Die Lichtemission wird anschließend durch ein Luminometer gemessen. Die Stärke des Lichtsignals korreliert mit dem Gehalt an ATP bzw. der Zellzahl in der Probe (79).

3.2.2.5. *Quantifizierung der Bakterien auf Implantaten nach deren Reinigung*

Für diesen Versuch wurden 30 3i T3-Implantate von Biomet verwendet (Tabelle 5). Jeder Versuchsgruppe wurden zufällig vier Implantate zugeordnet (Ausnahme: Negativkontrolle mit zwei Implantaten). Die Implantate – abgesehen von den Negativkontrollen – wurden wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben in vitro mit Speichel und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kontaminiert. Die in-vitro-Dekontamination erfolgte analog zur Beschreibung in Kapitel 3.2.2.2. Bei der Herstellung der 20 mM Hinokitiol-Lösung wurde darauf geachtet, dass diese nicht mehr als 2 % DMSO als Lösungsmittel enthält, da laut Protokoll des Herstellers DMSO in höheren Konzentrationen möglicherweise die Stärke des Lichtsignals beeinflusst (77).

Das BacTiter-Glo-Zellaufschluss-Reagenz wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers vorbereitet. Nach Auftauen von jeweils 20 ml Puffer bzw. Substrat (Aufbewahrung erfolgte bei -20° Celsius), wurden jeweils 10 ml Puffer unter sterilen Bedingungen in die substratgefüllten Fläschchen pipettiert. Das dadurch entstandene Zellaufschluss-Reagenz wurde gevortext, um vollständig in Lösung zu gehen. Anschließend wurde das Reagenz vor Benutzung 60 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um die Sensitivität zu erhöhen (77).

Nach zweimaligem Waschen der Implantate mit PBS und der experimentellen Reinigung wurden die Implantate einzeln in 24-Well-Schalen eingelagert, deren Wells jeweils mit einer Mischung aus 1 ml BHI und 1 ml Zellaufschluss-Reagenz gefüllt waren. Die Platten mit den Implantaten wurden im Anschluss fünf Minuten inkubiert. Danach wurden aus jedem Well vier Mal je 200 µl abpipettiert und in die Vertiefungen von opaken 96-Well-Schalen gegeben,

um pro Versuchsprobe jeweils vier Messwerte zu erhalten (n=4). Daraufhin erfolgte die Lumineszenzmessung (GloMax Navigator, Promega, Madison, WI, USA) unter Einhaltung des Messprotokolls für den Assay BacTiter-Glo mit einer Integrationszeit von 0,3 Sekunden pro Well.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Hinokitiol-, Chlorhexidin- und Natriumchlorid-Lösungen im Hauptversuch zu den antibakteriellen Effekten von Hinokitiol auf Titanimplantaten

Lösung	Zusammensetzung
Hinokitiol (Hk) - 1 M (Stammlösung) - 20 mM (Verdünnung)	656,8 mg Hk gelöst in 4 ml DMSO 800 µl Hk-Stammlösung + 39,2 ml BHI
Chlorhexidin (CHX) 0,2 %	36 ml aqua dest. + 4 ml CHX 2 %
Physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	500 ml aqua dest. + 4,5 g NaCl

Tabelle 5: Versuchsgruppen im Hauptversuch zur quantitativen Analyse von Bakterien auf Titanimplantaten mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay

Abkürzung Gruppenname	Beschreibung (Mengenangaben pro Well in 96-Well-Platte)
n.c.	Negativkontrolle: Implantate 3 Wochen in Medium mit Pen-Strep (50 µl pro 5 ml Medium) inkubiert
p.c.	Positivkontrolle: Implantate wurden nach in-vitro-Kontamination nicht gereinigt
he	Implantate in Hinokitiol eingebracht
ce	Implantate in Chlorhexidin eingebracht
ne	Implantate in physiologische Kochsalzlösung eingebracht
hr	Implantate mit Hinokitiol gereinigt
cr	Implantate mit Chlorhexidin gereinigt
nr	Implantate mit physiologischer Kochsalzlösung gereinigt

3.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Programms *IBM SPSS Statistics* (Version 27.0.1.0; IBM, New York, USA). Die Normalverteilung von stetigen Merkmalen wurde mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests und des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors geprüft. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assays lag bei den Werten der Agardiffusionstests überwiegend keine Normalverteilung vor ($p < 0,05$). Die Varianzhomogenität wurde mittels Levene-Test untersucht. Weder bei den Ergebnissen der Agardiffusionstests noch bei denen der ATP-Biolumineszenzassays liegt Varianzhomogenität vor ($p < 0,05$). Anschließend wurde eine univariate Analyse durchgeführt. Der Vergleich der Mittelwerte der Versuchsgruppen erfolgte mittels One-Way-Anova. Als Post-hoc-Tests wurden für Mehrfachvergleiche multiple t-Tests mit Bonferroni-Korrektur (Agardiffusionstests) oder der Games-Howell-Test (Bakterienquantifizierung auf Implantaten) angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ festgelegt, nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen wurde das korrigierte Signifikanzniveau von $p(\text{korr}) = 0,001$ (Agardiffusionstests mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*) bzw. $p(\text{korr}) = 0,0003$ (Agardiffusionstests mit *Streptococcus mutans*) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Agardiffusionstests

4.1.1. *Streptococcus mutans*

Proben der Positivkontrolle (Penicillin G) verursachten mit durchschnittlich 33,1 Millimetern den größten Hemmhof. Die Negativkontrolle DMSO hingegen führte zu keinerlei Hemmhofbildung. Hinokitiol führte ab einer Konzentration von 500 μM zur Ausbildung eines Hemmhofs, wobei der Mittelwert der Hemmhofgröße bei 500 μM Hinokitiol 9,1 mm betrug. Im Gegensatz dazu zeigte Zinkchlorid keinen antibakteriellen Effekt. Auch bewirkte Zinkchlorid keinerlei Steigerung der Hemmhofgröße in Kombination mit Hinokitiol – bei Kombination der beiden Substanzen entstanden Hemmhöfe, deren Größen der jeweiligen Hinokitiol-Konzentration entsprachen. Die kommerzielle Mundspüllösung bewirkte unverdünnt eine Hemmhofbildung von 16,1 mm und war somit mit der Hemmhofgröße von Hinokitiol 2500 μM , die 16,0 mm betrug, vergleichbar. Die zehn-prozentige Verdünnung der Mundspüllösung verursachte mit 8,1 mm einen etwa halb so großen Hemmhof wie die unverdünnte Zubereitung. Die einprozentige Lösung zeigte keinen Effekt gegenüber *Streptococcus mutans* (Abbildungen 1-6). Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und allen anderen Gruppen. Die Negativkontrolle differierte darüber hinaus signifikant mit weiteren Versuchsgruppen (Hinokitiol 2500 μM , Hinokitiol 500 μM , unverdünnte Mundspüllösung, 10-prozentige Mundspüllösung sowie die Mischungen aus Hinokitiol und Zinkchlorid mit den Konzentrationen Zinkchlorid 500 μM + Hinokitiol 500 μM , Zinkchlorid 20 μM + Hinokitiol 500 μM und Zinkchlorid 2500 μM + Hinokitiol 500 μM). Kein signifikanter Unterschied der Größe des Hemmhofs wurde für die Lösungen mit 2500 μM Hinokitiol und der unverdünnten Mundspüllösung beobachtet. Auch zwischen der 500 μM Hinokitiollösung und der 10-prozentigen Mundspüllösung fand sich kein signifikanter Unterschied. Auch die Größe der Hemmhöfe für die Kombinationen aus Zinkchlorid (2500 μM , 500 μM und 20 μM) und Hinokitiol (jeweils 500 μM) unterschieden sich weder signifikant von den Werten für Hinokitiol 500 μM noch untereinander. Einen Überblick über alle Ergebnisse der statistischen Auswertung der Agardiffusionstests liefern die Tabellen im Anhang (Kapitel 12.3). Tabelle 6 stellt eine Legende für die Nummerierung der Testplättchen auf den Abbildungen der Agardiffusionstests in Kapitel 4.1 dar.

Tabelle 6: Legende zur Nummerierung der Testplättchen auf den Abbildungen 1-5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17

Nummer	In Testplättchen enthaltene Substanz(en)
1	Penicillin G (1 unit)
2	Amoxicillin 10 µg
3	Metronidazol 5 µg
4	Metronidazol 0,25 µg
5	DMSO/Flüssigmedium
6	DMSO
7	Hinokitiol 40 mM
8	Hinokitiol 20 mM
9	Hinokitiol 10 mM
10	Hinokitiol 5 mM
11	Hinokitiol 2500 µM
12	Hinokitiol 500 µM
13	Hinokitiol 100 µM
14	Hinokitiol 20 µM
15	unverdünnte Mundspüllösung
16	10-prozentige Mundspüllösung
17	1-prozentige Mundspüllösung
18	Zinkchlorid 2500 µM
19	Zinkchlorid 500 µM
20	Zinkchlorid 100 µM
21	Zinkchlorid 20 µM
22	Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 500 µM
23	Hinokitiol 100 µM + Zinkchlorid 500 µM
24	Hinokitiol 20 µM + Zinkchlorid 500 µM
25	Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 20 µM
26	Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 2500 µM

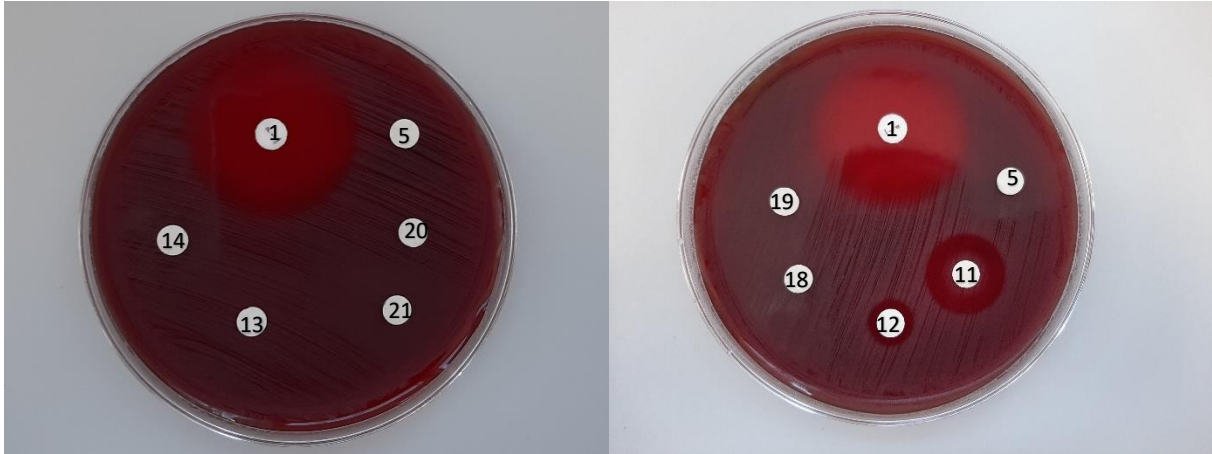


Abbildung 1: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Zinkchlorid 100 µM (20), Zinkchlorid 20 µM (21), Hinokitiol 100 µM (13) und Hinokitiol 20 µM (14).

Abbildung 2: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), Hinokitiol 2500 µM (11) und Hinokitiol 500 µM (12). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Zinkchlorid 2500 µM (18) und Zinkchlorid 500 µM (19).

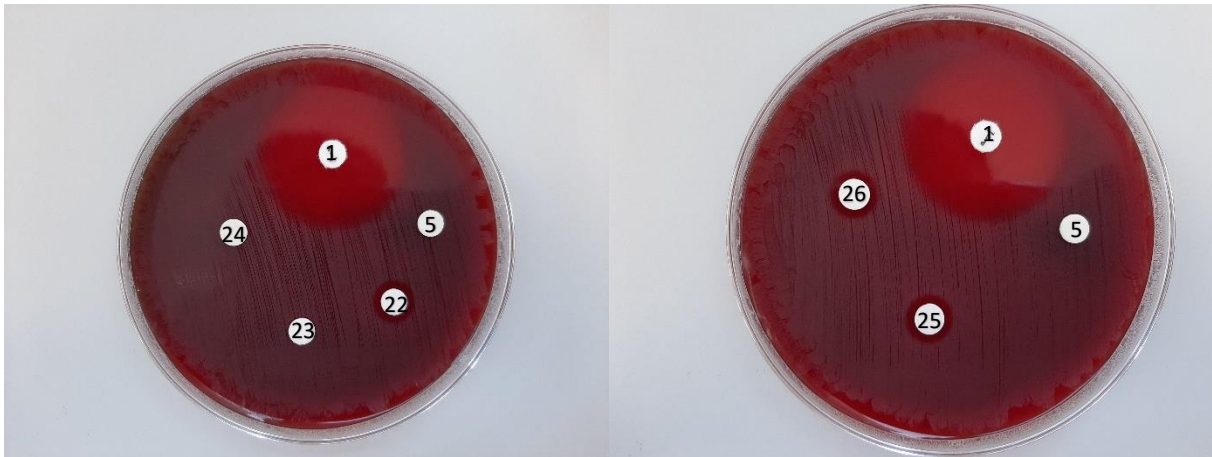


Abbildung 3: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout C. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1) und Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 500 µM (22). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Hinokitiol 100 µM + Zinkchlorid 500 µM (23) und Hinokitiol 20 µM + Zinkchlorid 500 µM (24)

Abbildung 4: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout D. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 20 µM (25) und Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 2500 µM (26). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5)



Abbildung 5: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout E. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), unverdünnter Mundspüllösung (15) und 10-prozentiger Mundspüllösung (16). Keine Hemmhofbildung bei 1-prozentiger Mundspüllösung (17)

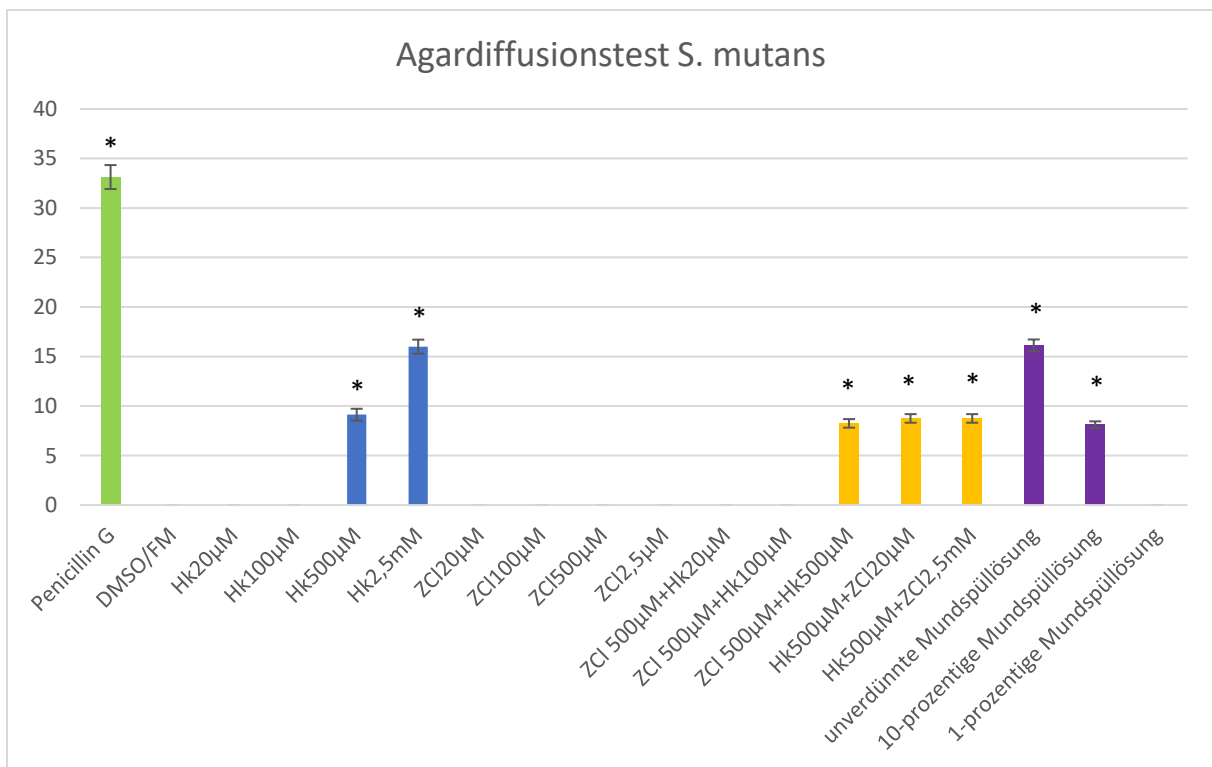


Abbildung 6: Ergebnisse der Agardiffusionstests für *Streptococcus mutans*; Penicillin G = Positivkontrolle, DMSO/FM = Negativkontrolle bestehend aus DMSO und flüssigem Nährmedium, Hk = Hinokitiol, ZCl = Zinkchlorid; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,0003$)

4.1.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Zinkchlorid alleine sowie in Kombination mit Hinokitiol zeigte im Vorversuch auch für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* keine Wirkung. Bei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entstand der größte Hemmhof durch die unverdünnte Mundspüllösung (24,9 mm), gefolgt von der Positivkontrolle Amoxicillin mit einer Hemmhofgröße von 24,4 mm. Um die Plättchen der Negativkontrolle DMSO bildete sich kein Hemmhof (Abbildungen 7 und 8).

Anhand des Post-hoc-Tests konnte kein signifikanter Unterschied der antimikrobiellen Wirkung der Mundspüllösung gegenüber Amoxicillin festgestellt werden. Alle anderen Versuchsgruppen unterscheiden sich signifikant von der Positivkontrolle. Die Abweichung der Negativkontrolle ist signifikant im Vergleich zu allen Testgruppen bis auf Hinokitiol 20 µM und 100 µM sowie der Mundspüllösung in 1-prozentiger Lösung. Die Hemmhofgröße des Mundsprays in 10-prozentiger Lösung differiert nicht signifikant von der Hemmhofgröße, die durch Hinokitiol 2500 µM entstand (Abbildung 9).

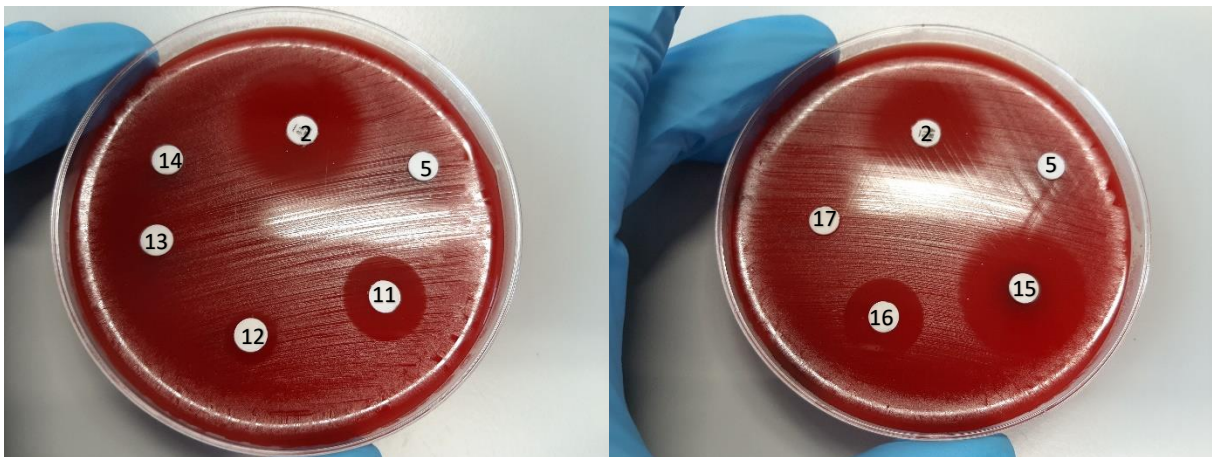


Abbildung 7: Agardiffusionstest mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit Amoxicillin (2), Hinokitiol 2500 µM (11) und Hinokitiol 500 µM (12). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Hinokitiol 100 µM (13) und Hinokitiol 20 µM (14).

Abbildung 8: Agardiffusionstest mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit Amoxicillin (2), unverdünnter Mundspüllösung (15) und 10-prozentiger Mundspüllösung (16). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).

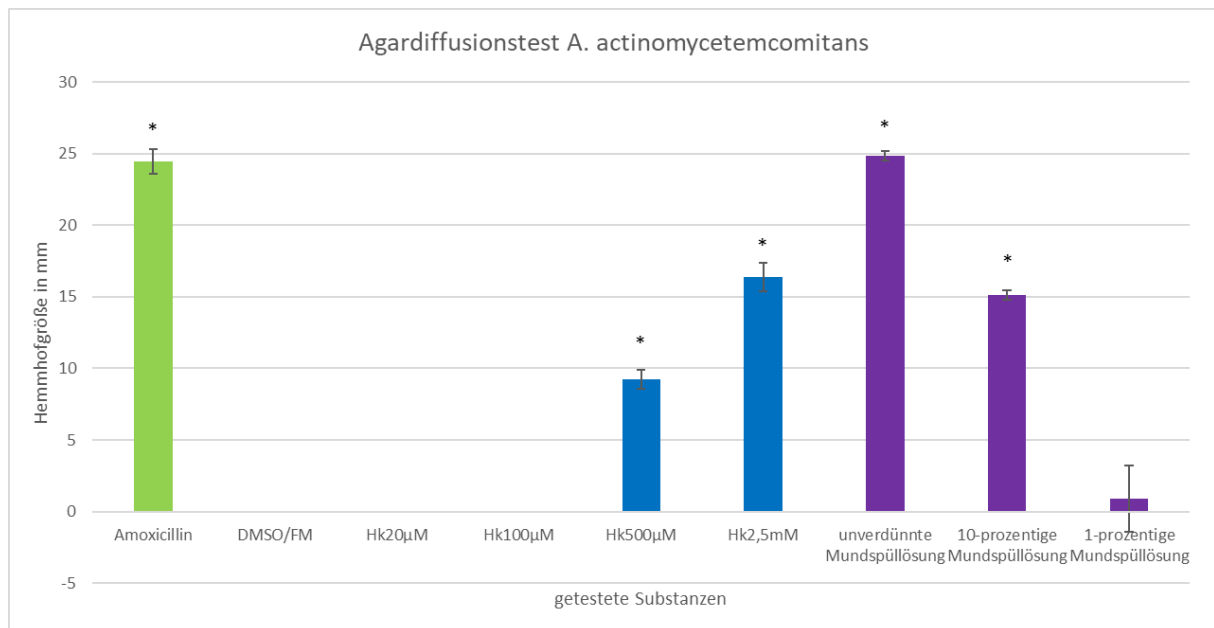


Abbildung 9: Ergebnisse der Agardiffusionstests für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Amoxicillin = Positivkontrolle, DMSO/FM = Negativkontrolle bestehend aus DMSO und flüssigem Nährmedium, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$)

4.1.3. *Actinomyces viscosus*

Hinokitiol-Lösungen einer Konzentration von 20 mM und 40 mM sowie die unverdünnte Mundspüllösung zeigten im Agardiffusionstest eine deutliche antibakterielle Wirkung gegen *Actinomyces viscosus* (Abbildungen 10-12). Diese war jedoch schwächer als mit der Positivkontrolle (Penicillin), die in dieser Versuchsreihe den größten Hemmhof erzeugte und sich signifikant ($p < 0,0001$) von allen anderen Testgruppen unterscheidet. Die Negativkontrolle DMSO verursachte keine Hemmhofbildung. Die multiplen t-Tests ergaben nach Bonferroni-Korrektur signifikante Abweichungen zwischen der Negativkontrolle und Penicillin, Hinokitiol 40 mM, Hinokitiol 20 mM und der Mundspüllösung bei einem korrigierten Signifikanzniveau von $p(\text{korr}) = 0,001$.

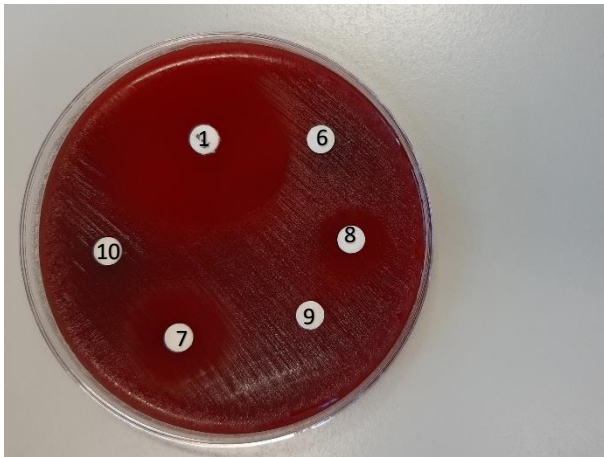


Abbildung 10: Agardiffusionstest mit *Actinomyces viscosus*, Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), Hinokitiol 20 mM (8) und Hinokitiol 40 mM (7). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), Hinokitiol 10 mM (9) und Hinokitiol 5 mM (10).

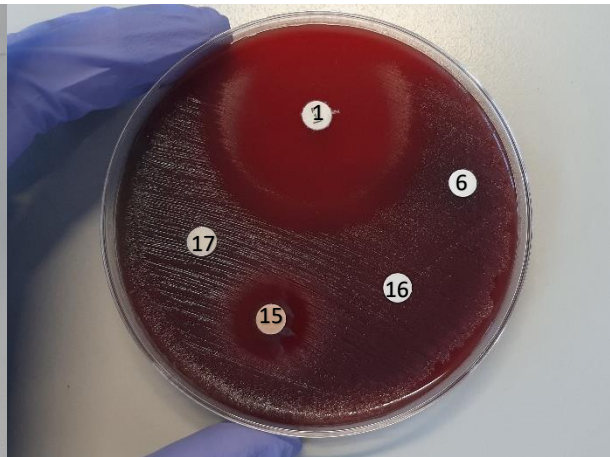


Abbildung 11: Agardiffusionstest mit *Actinomyces viscosus*, Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1) und unverdünnter Mundspüllösung (15). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), 10-prozentiger Mundspüllösung (16) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).

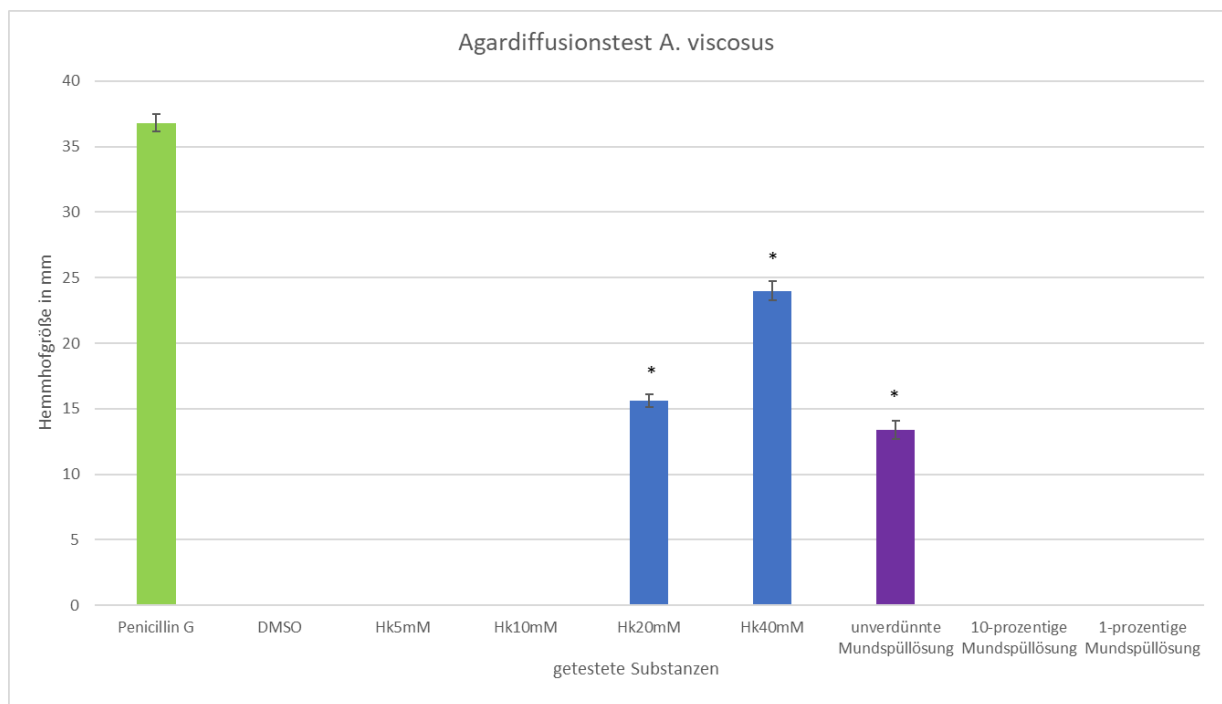


Abbildung 12: Ergebnisse der Agardiffusionstests für *Actinomyces viscosus*; Penicillin G = Positivkontrolle, DMSO = Negativkontrolle, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$)

4.1.4. *Fusobacterium nucleatum*

Auch für *Fusobacterium nucleatum* zeigte sich ab einer Hinokitiol-Konzentration von 20 mM eine deutliche antibakterielle Aktivität. Die Positivkontrolle Metronidazol verursachte einen großen (51,3 mm), die Negativkontrolle keinen Hemmhof (Abbildungen 13-15). Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Metronidazol und allen anderen Versuchsgruppen sowie zwischen der Negativkontrolle und Metronidazol, Hinokitiol 40 mM und 20 mM und der unverdünnten Mundspüllösung. Die Hemmhofgröße der letzteren wich nicht signifikant von der Hemmhofgröße ab, die durch Hinokitiol 20 mM entstand.

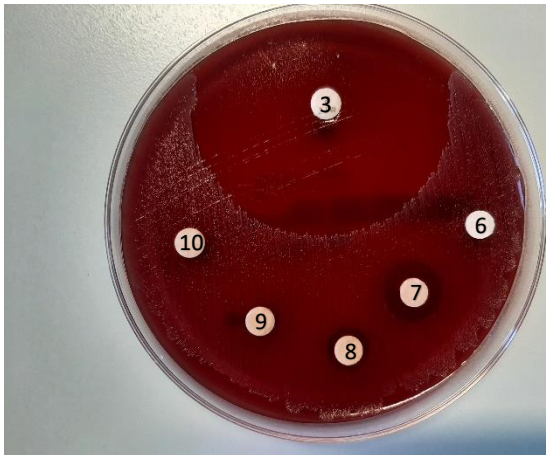


Abbildung 13: Agardiffusionstest mit *Fusobacterium nucleatum*, Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit 5 µg Metronidazol (3), Hinokitiol 40 mM (7) und Hinokitiol 20 mM (8). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), Hinokitiol 10 mM (9) und Hinokitiol 5 mM (10).



Abbildung 14: Agardiffusionstest mit *Fusobacterium nucleatum*, Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit 5 µg Metronidazol (3) und unverdünnter Mundspüllösung (15). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), 10-prozentiger Mundspüllösung (16) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).

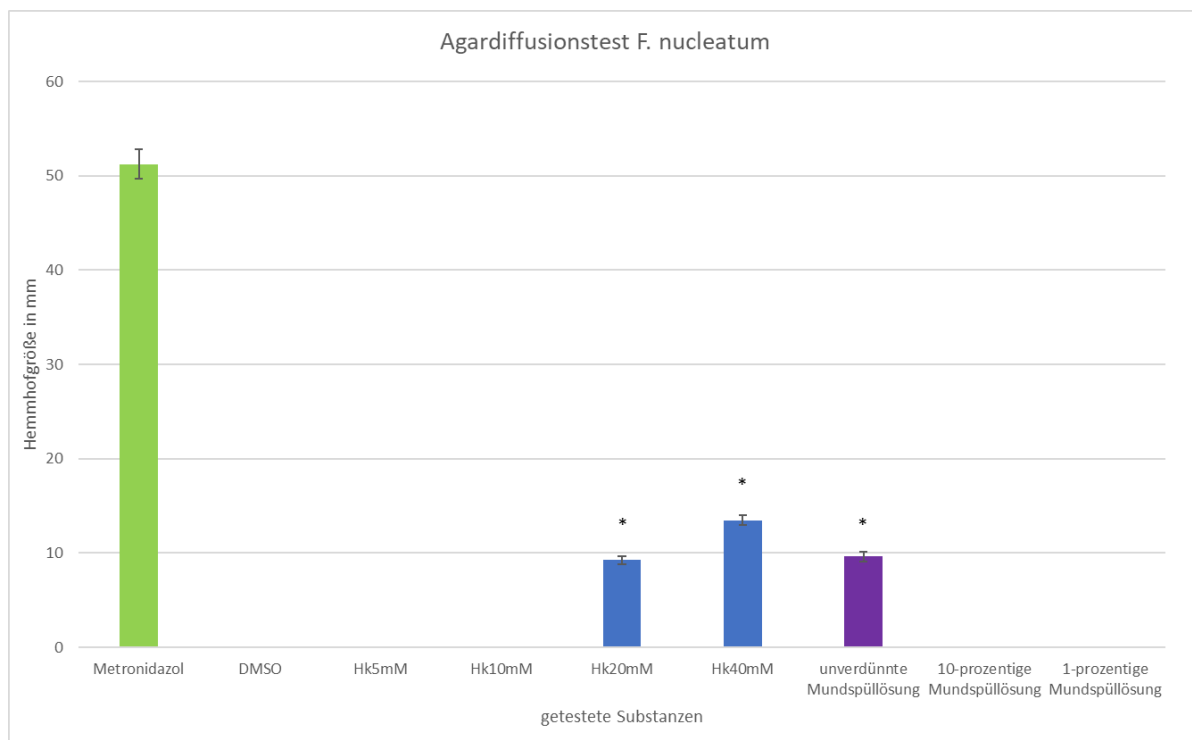


Abbildung 15: Ergebnisse der Agardiffusionstests für *Fusobacterium nucleatum*; Metronidazol = Positivkontrolle, DMSO = Negativkontrolle, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$)

4.1.5. *Porphyromonas gingivalis*

Für *Porphyromonas gingivalis* wurde durch Hinokitiol-Lösungen ab einer Konzentration von 5 mM ein Hemmhof verursacht. Die Zubereitung der Mundspüllösung bewirkte nur unverdünnt eine Hemmhofbildung (Abbildungen 16 und 17). *Porphyromonas gingivalis* zeigte sich sehr empfindlich gegenüber der Positivkontrolle Metronidazol. Bei Verwendung der kommerziell erhältlichen Plättchen mit 5 µg Wirkstoffgehalt fand auf der ganzen Agarplatte kein Bakterienwachstum mehr statt. Bei einem Wirkstoffgehalt von 0,25 µg Metronidazol pro Plättchen entstanden Hemmhöfe mit einer Größe von 39,6 mm. Die Negativkontrolle verursachte keinen Hemmhof (Abbildung 18). Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede zwischen der Positivkontrolle und allen anderen Versuchsgruppen sowie zwischen Negativkontrolle und sämtlichen Gruppen außer der Zubereitung der Mundspüllösung in 10 %iger bzw. 1 %iger Lösung, welche wie die Negativkontrolle keinen Hemmhof erzeugte. Die Testgruppen Hinokitiol 5 mM, Hinokitiol 10 mM und Mundspüllösung (unverdünnt) unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

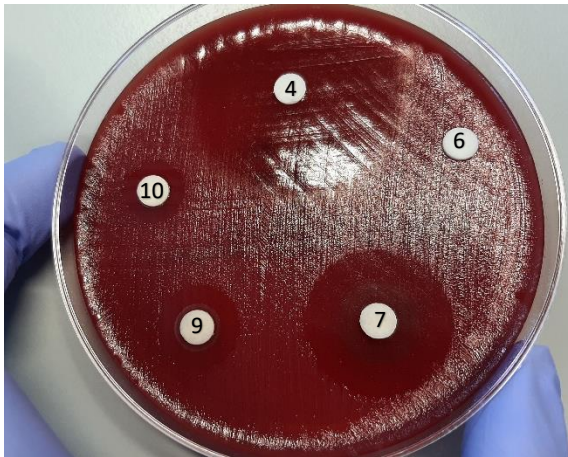


Abbildung 16: Agardiffusionstest mit *Porphyromonas gingivalis*, Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit 0,25 µg Metronidazol (4), Hinokitiol 40 mM (7), Hinokitiol 10 mM (9) und Hinokitiol 5 mM (10). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6).

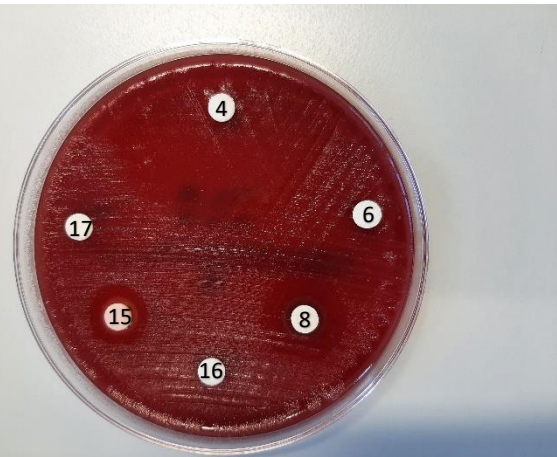


Abbildung 17: Agardiffusionstest mit *Porphyromonas gingivalis*, Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit 0,25 µg Metronidazol (4), Hinokitiol 20 mM (8) und unverdünnter Mundspüllösung (15). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), 10-prozentiger Mundspüllösung (16) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).

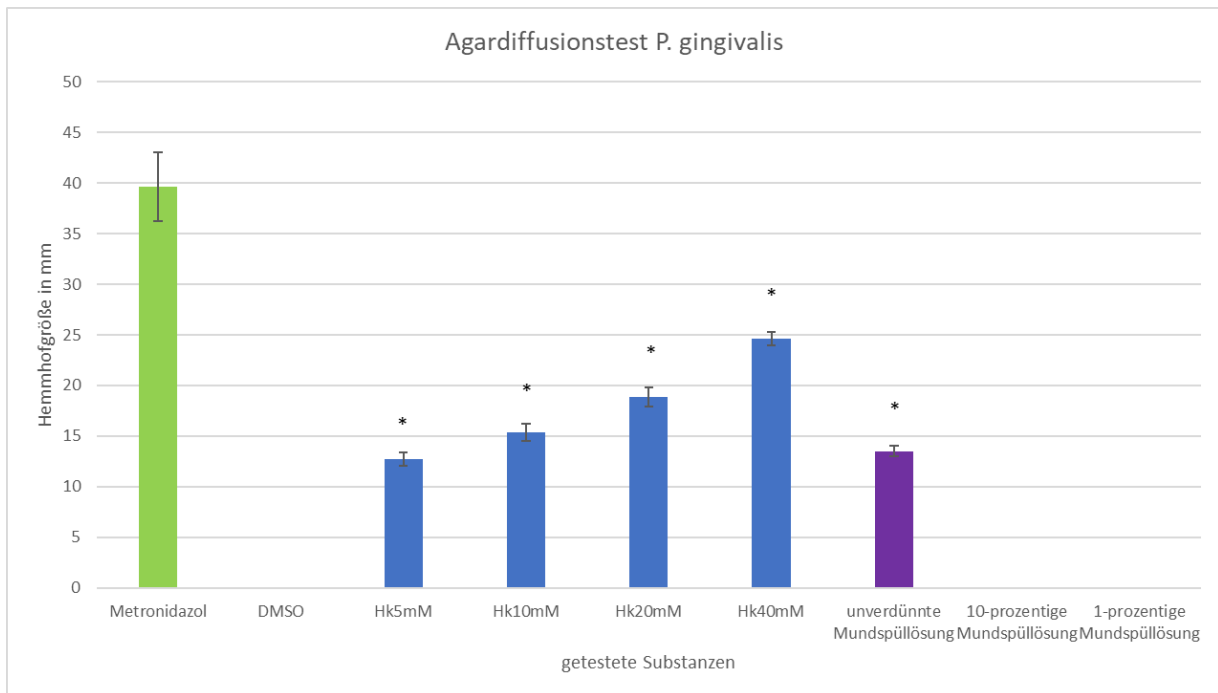


Abbildung 18: Ergebnisse der Agardiffusionstests für *Porphyromonas gingivalis*; Metronidazol = Positivkontrolle, DMSO = Negativkontrolle, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$)

4.2. Antibakterielle Effekte auf Titanimplantaten

4.2.1. Qualitative rasterelektronenmikroskopische Analyse

4.2.1.1. Positivkontrolle

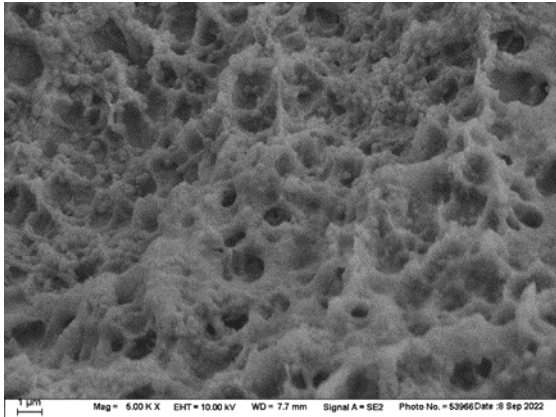


Abbildung 19: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Positivkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung. Zahlreiche Bakterien sind als kugelförmige Strukturen erkennbar. Bei den flächigen Auflagerungen handelt es sich vermutlich um Reste des Flüssigmediums.

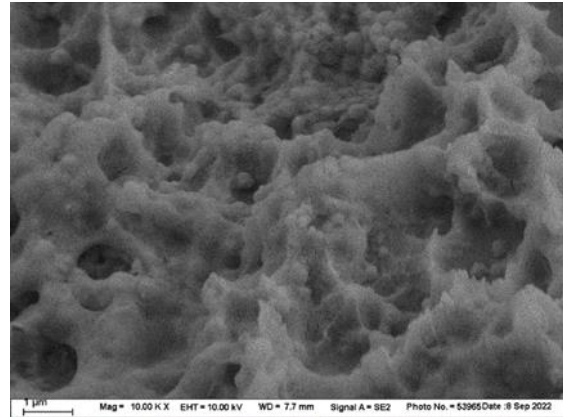


Abbildung 20: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Positivkontrolle) in 10000-facher Vergrößerung. Zahlreiche Bakterien sind als kugelförmige Strukturen erkennbar. Bei den flächigen Auflagerungen handelt es sich vermutlich um Reste des Flüssigmediums.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen Ausschnitte aus dem Gewindeanteil eines Implantats, das eine Woche in Speichel und drei Wochen in einer Flüssigkultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inkubiert wurde (10000-fache bzw. 5000-fache Vergrößerung). Es sind zahlreiche kugelförmige Strukturen erkennbar, bei denen es sich um Bakterien handelt. Im unteren Anteil der Darstellung sind flächige Auflagerungen zu erkennen. Hierbei handelt es sich möglicherweise um Reste des flüssigen Nährmediums.

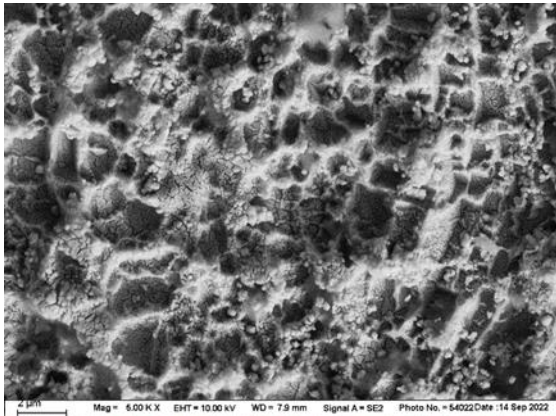


Abbildung 21: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Positivkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung. Neben kugelförmigen Bakterien ist die Implantatoberfläche als gebrochen-flächig erscheinende Struktur zu erkennen.

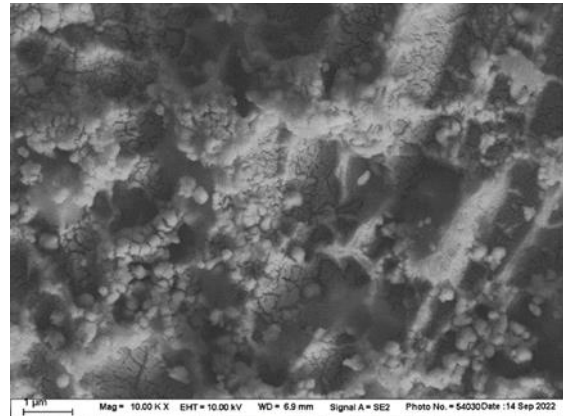
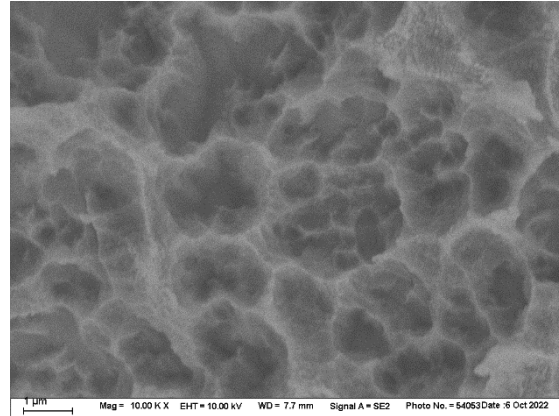
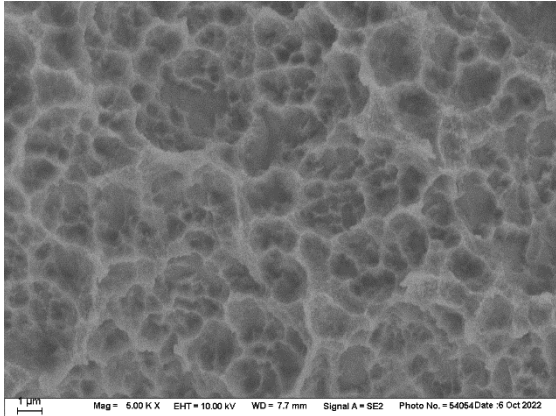


Abbildung 22: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Positivkontrolle) in 10000-facher Vergrößerung. Neben kugelförmigen Bakterien ist die Implantatoberfläche als gebrochen-flächig erscheinende Struktur zu erkennen.

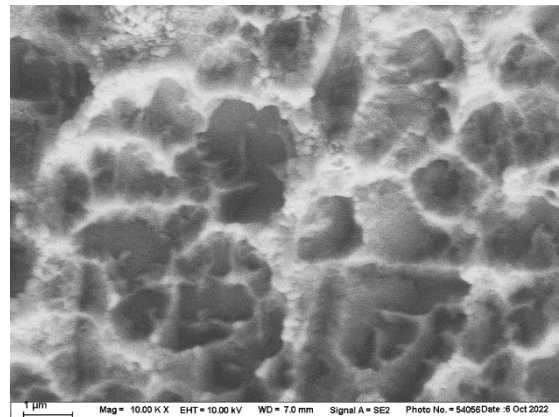
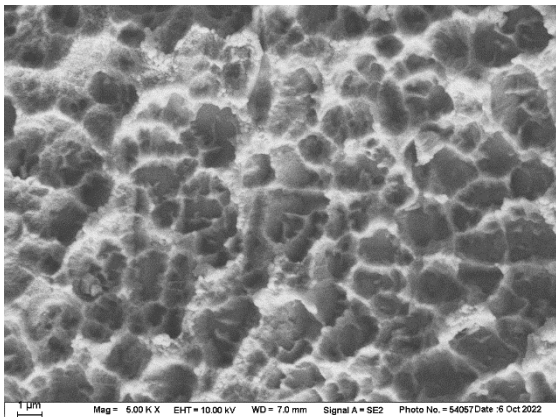
Die Abbildungen 21 und 22 zeigen REM-Aufnahmen in 5000-facher und 10000-facher Vergrößerung von Ausschnitten des cervikalen Anteils der Implantate, die eine polierte und

somit glattere Oberflächenmorphologie als der Gewindeanteil aufweist. Die größeren, kugelförmigen Bakterien sind zu unterscheiden von der gebrochen-flächig erscheinenden Struktur, die Bestandteil der Implantatoberfläche ist.

4.2.1.2. *Negativkontrolle*



Auf den Abbildungen der Negativkontrolle (Abb. 23 und 24) sind nach Inkubation in sterilem Flüssigmedium keine Bakterien auf der Implantatoberfläche anzutreffen.



Auch auf dem polierten cervikalen Anteil der Implantatoberfläche finden sich keine Bakterien (Abb. 25 und 26).

4.2.1.3. In Hinokitiol eingebrachtes Implantat

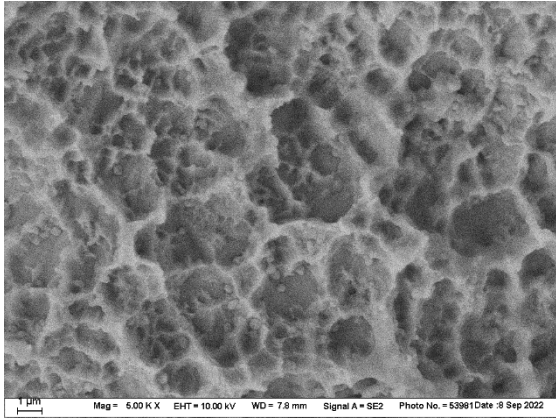


Abbildung 27: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in Hinokitiol in 5000-facher Vergrößerung. Es sind vereinzelt Bakterien vorhanden.

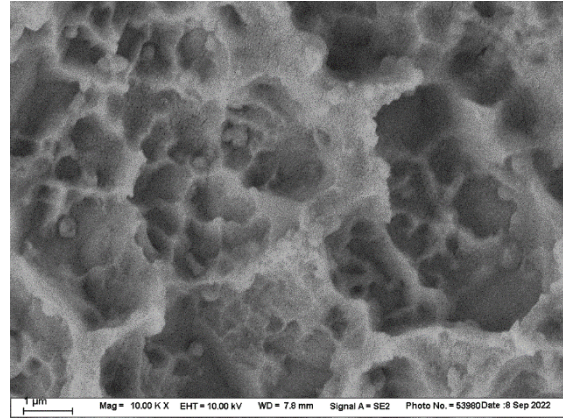


Abbildung 28: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in Hinokitiol in 10000-facher Vergrößerung. Es sind vereinzelt Bakterien vorhanden.

Im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 19 und 20) ist eine deutliche Abnahme der Anzahl an Bakterien auf den Gewindeanteilen der Implantate, die in Hinokitiol-Lösung eingebracht wurden, festzustellen. Auf den Fotos sind nur noch vereinzelt Bakterien sichtbar (Abb. 27 und 28).

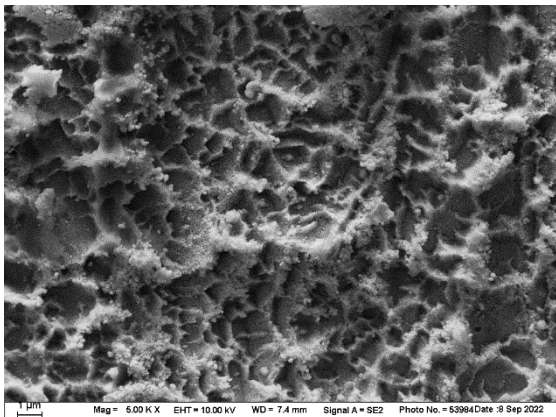


Abbildung 29: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in Hinokitiol in 5000-facher Vergrößerung. Es sind wenige Bakterien sichtbar.

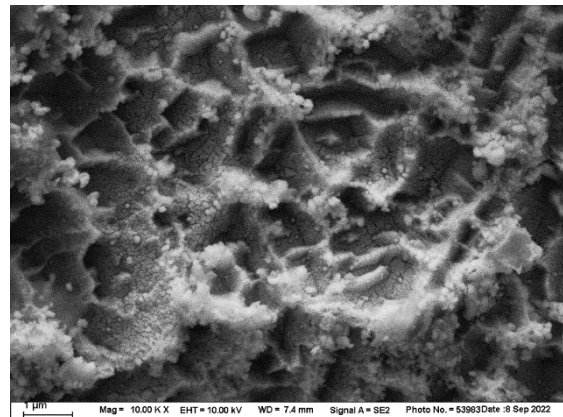


Abbildung 30: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in Hinokitiol in 10000-facher Vergrößerung. Es sind wenige Bakterien sichtbar.

Auch auf den cervikalen Anteilen der in Hinokitiol-Suspension eingebrachten Implantate sind nur wenige Bakterien vorhanden (Abb. 29 und 30). Der Vergleich mit den entsprechenden Bildern der Positivkontrolle (Abb. 21 und 22) ist jedoch nicht so deutlich wie im Gewindeanteil. Die Anzahl der Bakterien scheint durch die Behandlung mit Hinokitiol auf den cervikalen Implantatoberflächen lediglich mäßig abgenommen zu haben.

4.2.1.4. In Chlorhexidin eingebrachtes Implantat

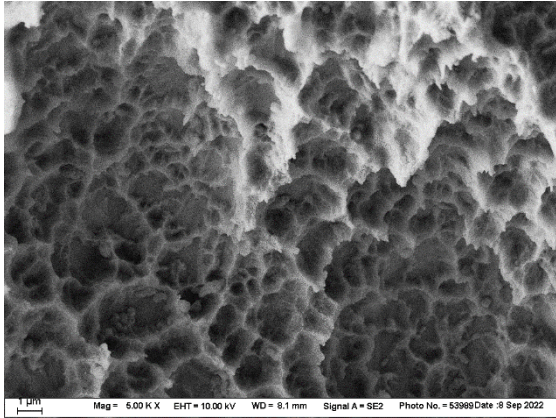


Abbildung 31: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung zeigt sehr wenige Bakterien.

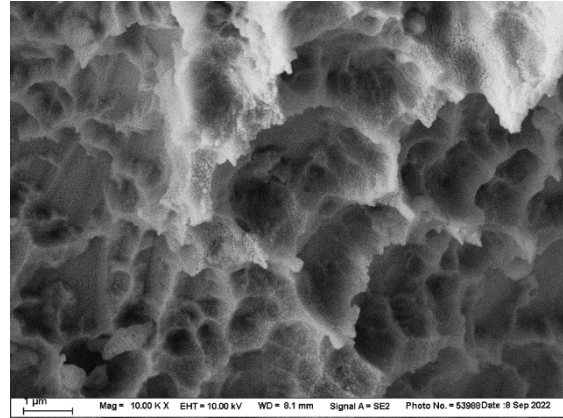


Abbildung 32: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung zeigt sehr wenige Bakterien.

Die Abbildungen 31 und 32 zeigen eine starke Verminderung der Anzahl von Bakterien auf den Implantaten nach Einbringen in eine Chlorhexidin-Lösung (0,2 %). Die Abnahme wird nicht nur im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 19 und 20) deutlich. Auch gegenüber den Implantaten, die in Hinokitiol eingebracht wurden (Abb. 27 und 28), zeigt sich eine Reduktion der Bakterienmenge, da auf den Abbildungen 31 und 32 nur sehr wenige kugelige Strukturen, die Bakterien darstellen, zu sehen sind.

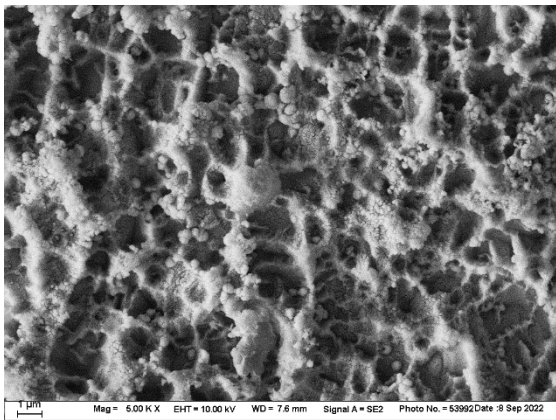


Abbildung 33: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.

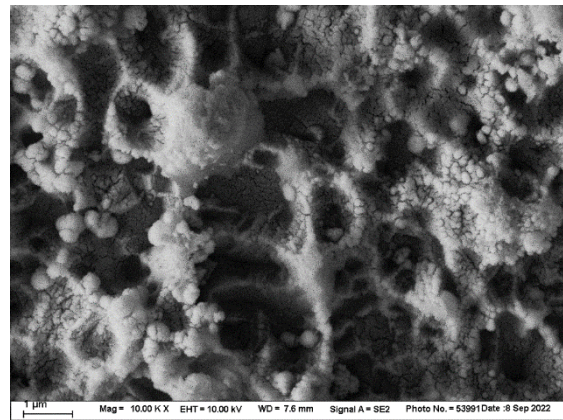


Abbildung 34: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.

Im Gegensatz dazu weist der polierte cervikale Anteil der Implantatoberfläche auch nach Behandlung mit Chlorhexidin noch einige Bakterien auf (Abb. 33 und 34).

4.2.1.5. In physiologische Kochsalzlösung eingebrachtes Implantat

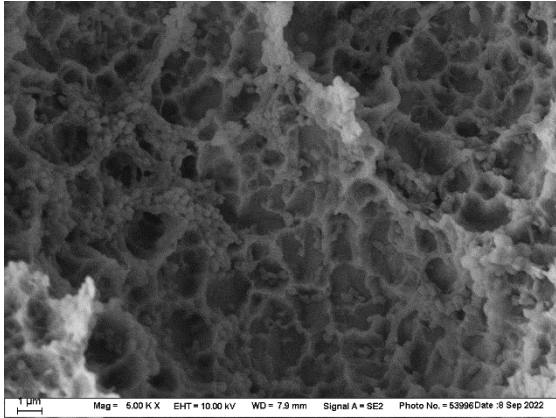


Abbildung 35: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung. Auf der Implantatoberfläche befinden sich viele Bakterien.

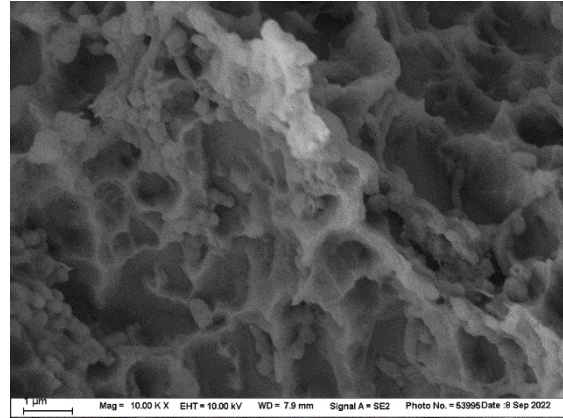


Abbildung 36: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung. Auf der Implantatoberfläche befinden sich viele Bakterien.

Auf den Abbildungen 35 und 36 sind deutlich mehr Bakterien erkennbar als auf den entsprechenden Bildern der in Hinokitiol (Abb. 27 und 28) bzw. Chlorhexidin (Abb. 31 und 32) eingebrachten Implantate. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 19 und 20) jedoch hat sich die Bakterienmenge auch durch das zweistündige Einbringen des Implantats in physiologische Kochsalzlösung verringert.

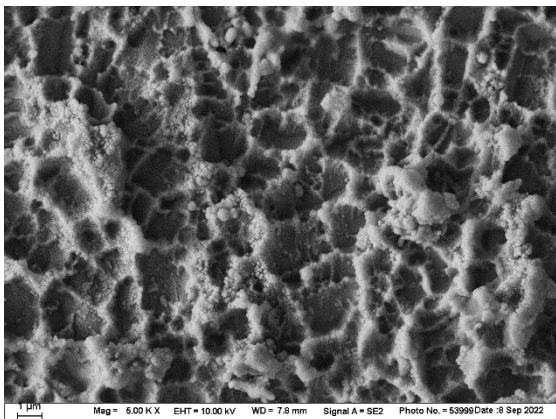


Abbildung 37: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats.

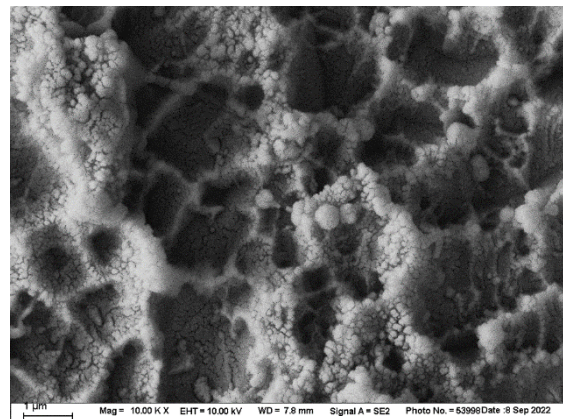


Abbildung 38: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats.

Auf den Abbildungen 37 und 38, die Ausschnitte der cervikalen Implantatoberflächen der in physiologische Kochsalzlösung eingebrachten Implantate zeigen, sind weniger Bakterien zu sehen, als auf den entsprechenden Fotos des Gewindeanteils (Abb. 35 und 36).

4.2.1.6. Mit in Hinokitiol getränktem Schaumstoffpellet gereinigtes Implantat

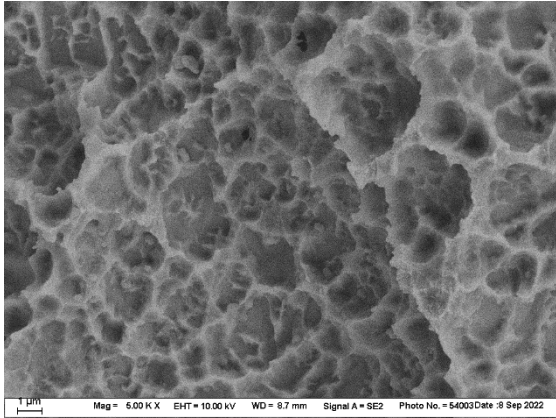


Abbildung 39: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 5000-facher Vergrößerung zeigt vereinzelte Bakterien auf der Implantatoberfläche.

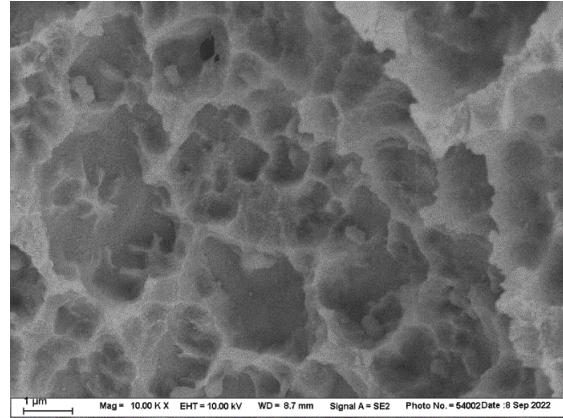


Abbildung 40: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 10000-facher Vergrößerung zeigt vereinzelte Bakterien auf der Implantatoberfläche.

Nach mechanischer Reinigung der Implantatoberfläche durch ein Hinokitiol getränktes Schaumstoffpellet für 60 Sekunden konnte ein Großteil der anhaftenden Bakterien entfernt werden. Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind nur noch vereinzelte Bakterien sichtbar (Abb. 39 und 40). Auf den Bildern, die einen entsprechenden Implantatausschnitt nach Einbringen in Hinokitiol zeigen (Abb. 27 und 28), sind demgegenüber deutlich mehr Bakterien erkennbar.

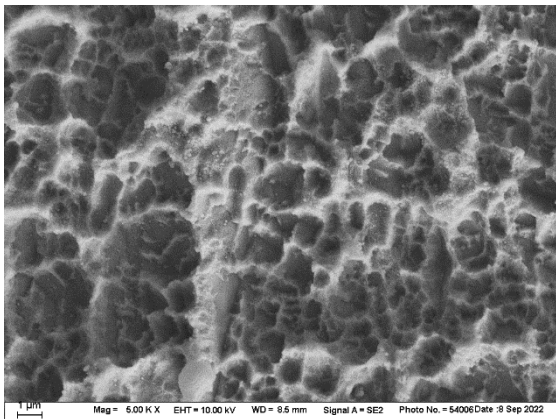


Abbildung 41: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 5000-facher Vergrößerung. Es sind keine Bakterien sichtbar.

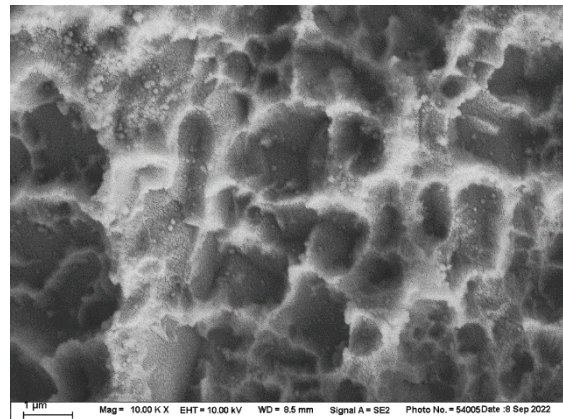


Abbildung 42: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 10000-facher Vergrößerung. Es sind keine Bakterien sichtbar.

In den Abbildungen 41 und 42, die einen Ausschnitt des polierten Anteils der Implantatoberfläche nach Reinigung mit Hinokitiol zeigen, sind keine Bakterien anzutreffen.

4.2.1.7. Mit in Chlorhexidin getränktem Schaumstoffpellet gereinigtes Implantat

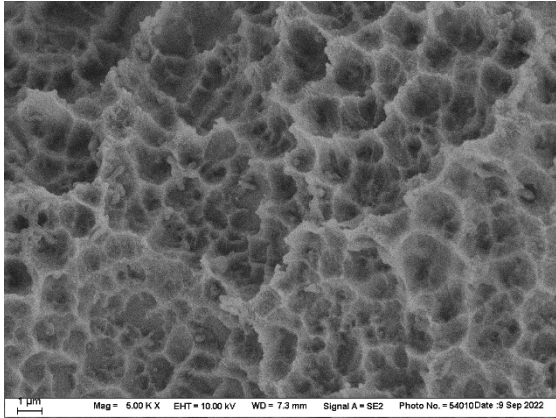


Abbildung 43: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung zeigt nur sehr wenige Bakterien.

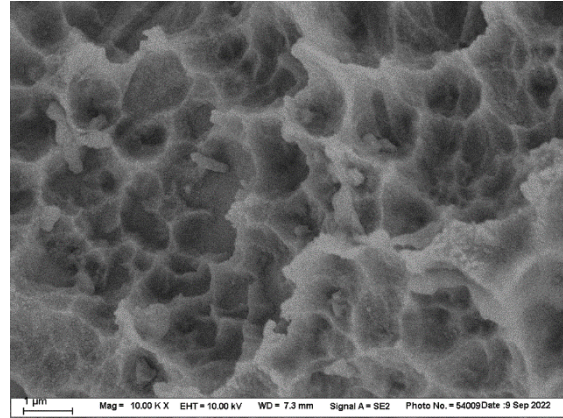


Abbildung 44: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung zeigt nur sehr wenige Bakterien.

Nach mechanischer Bearbeitung der Implantatoberfläche mit einem Pellet, das mit Chlorhexidin getränkt war, sind nur sehr wenige Bakterien auf dem Gewindeanteil des Implantats verblieben (Abb. 43 und 44).

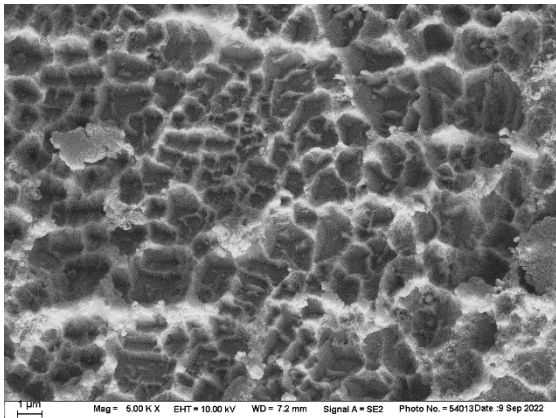


Abbildung 45: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung. Es sind kaum Bakterien vorhanden.

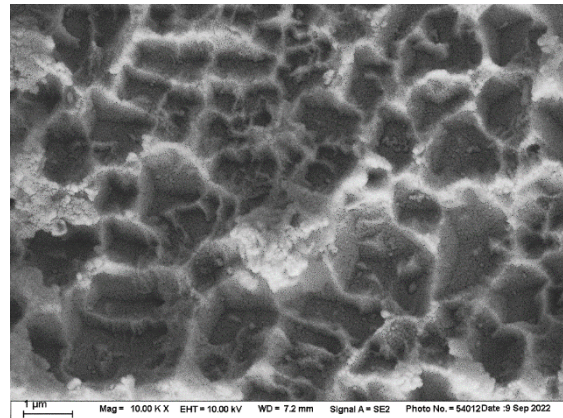


Abbildung 46: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung. Es sind kaum Bakterien vorhanden.

Auf dem cervikalen Anteil der mit Chlorhexidin gereinigten Implantatoberfläche sind kaum Bakterien sichtbar (Abb. 45 und 46).

4.2.1.8. *Mit in physiologischer Kochsalzlösung getränktem Schaumstoffpellet gereinigtes Implantat*

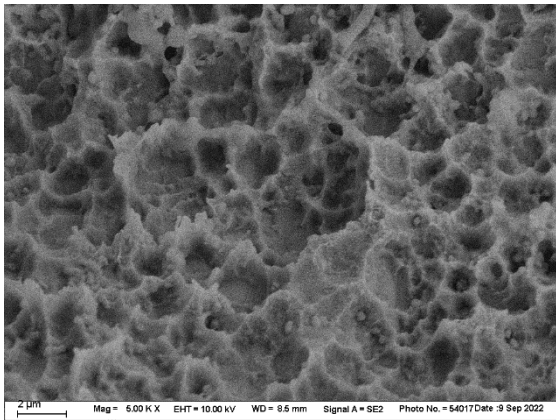


Abbildung 47: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.

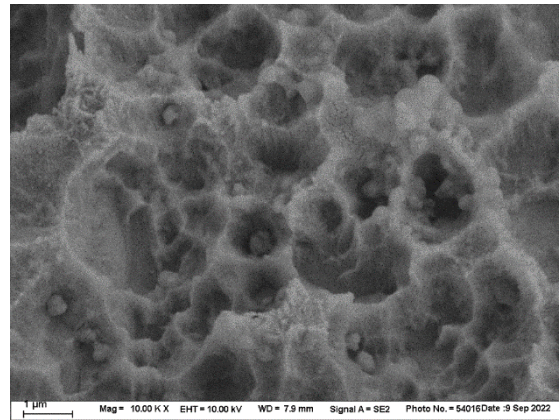


Abbildung 48: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.

Vergleicht man die Abbildungen 47 und 48 mit den REM-Aufnahmen der mit Hinokitiol (Abb. 39 und 40) bzw. Chlorhexidin (Abb. 43 und 44) gereinigten Implantate, stellt man fest, dass nach Behandlung des hier abgebildeten Implantats mit physiologischer Kochsalzlösung deutlich mehr Bakterien der Implantatoberfläche anhaften.

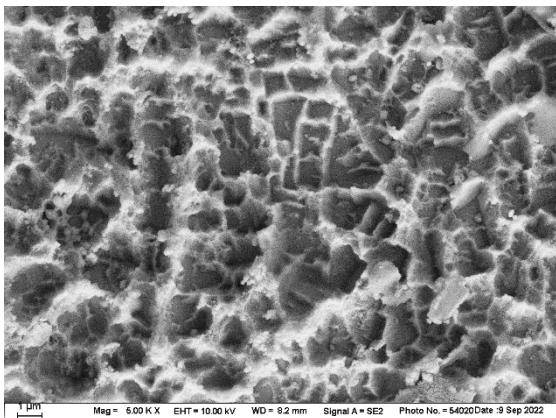


Abbildung 49: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats.

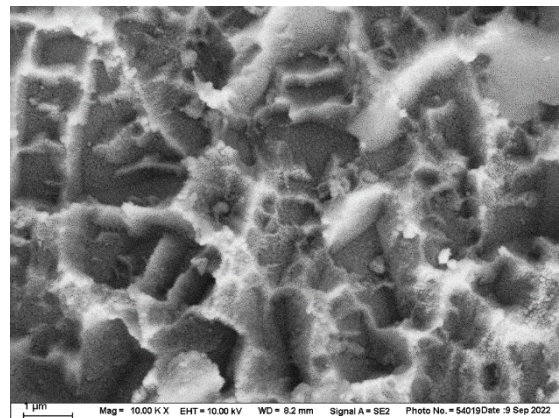


Abbildung 50: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats.

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen den cervikalen Bereich der Implantatoberfläche nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung. Die Anzahl der auf der Implantatoberfläche verbliebenen Bakterien scheint auf dem polierten Implantatanteil (Abb. 49 und 50) etwas stärker abgenommen zu haben als im Gewindebereich (Abb. 47 und 48). Im Vergleich zu den Implantaten, die mit Chlorhexidin (Abb. 45 und 46) bzw. Hinokitiol (Abb. 41 und 42) gereinigt wurden, befanden sich auf den mit Kochsalzlösung behandelten Implantaten jedoch noch verhältnismäßig viele Bakterien.

4.2.2. Quantifizierung der auf den Implantaten verbliebenen Bakterien mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay

Das relative Lumineszenzsignal der Positivkontrolle (3044, Standardabweichung 763) ist im Vergleich zur Negativkontrolle (469, Standardabweichung 75, $p < 0,0001$) etwa sechsmal höher. Somit war auf den in Speichel bzw. einer Flüssigkultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* eingebrachten Implantaten Bakterienwachstum anzutreffen. Beim Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen lässt sich feststellen, dass das Lumineszenzsignal aller Gruppen im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant unterschiedlich war. Alle drei getesteten Substanzen (Chlorhexidin, Hinokitiol und Natriumchlorid) sowie die beiden Reinigungsmethoden (Einbringen der Implantate in Lösungen der Wirkstoffe, mechanische Behandlung mit den Substanzen) haben die Menge der Bakterien auf den Implantatoberflächen signifikant reduziert. Am effektivsten war jedoch die Bakterienreduktion mit Chlorhexidin. Durch Chlorhexidin konnte die Bakterienzahl auf den Implantaten nahezu auf den Wert der Negativkontrolle gesenkt werden. Mit Ausnahme der Positivkontrolle blieben am meisten Bakterien auf den mit Kochsalzlösung manuell behandelten Implantaten zurück (das relative Lumineszenzsignal nach mechanischer Reinigung betrug 1478, Standardabweichung 297; nach Einbringen in Kochsalzlösung betrug es 1222, Standardabweichung 220). Nach Reinigung in Hinokitiol (mechanische Reinigung: relatives Lumineszenzsignal 1020, Standardabweichung 221; Einbringen in Hinokitiol: 933, Standardabweichung 114) verblieben etwa doppelt so viele Bakterien auf den Implantaten wie nach entsprechender Behandlung mit Chlorhexidin (mechanische Reinigung: relatives Lumineszenzsignal 501, Standardabweichung 43, $p < 0,0001$; Einbringen in Chlorhexidin: 602, Standardabweichung 46, $p < 0,0001$). Dass die Behandlung mit Chlorhexidin mehr Bakterien als mit Hinokitiol entfernte, nach Behandlung mit den beiden Substanzen jedoch im Vergleich zur Kochsalzlösung, die als Behandlungsmethode im Sinne einer Negativkontrolle fungierte, weniger Bakterien auf den Implantatoberflächen zurückblieben, wird sowohl durch die Quantifizierung der Mikroorganismen mittels ATP-Biolumineszenzassay (Abbildung 51) als auch durch die REM-Abbildungen (Kapitel 4.2.1) bestätigt.

Die Lumineszenzwerte fast aller Versuchsgruppen unterscheiden sich signifikant voneinander. Die einzigen Ausnahmen bilden die Negativkontrolle und die mit Chlorhexidin gereinigten Implantate ($p = 0,94$), die in NaCl eingebracht wurden und die mit NaCl ($p = 0,15$) bzw. Hinokitiol mechanisch gereinigten ($p = 0,19$) Implantate sowie die in Hinokitiol eingebrachten und die damit manuell behandelten Implantate ($p = 0,85$).

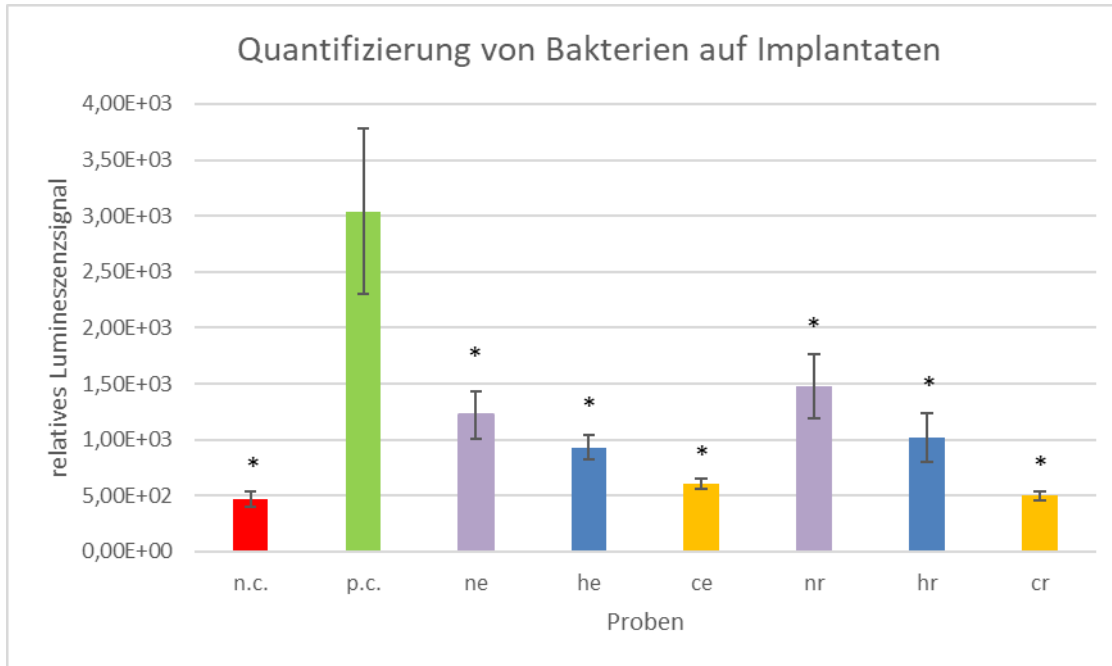


Abbildung 51: Ergebnisse des BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assays zur Quantifizierung der auf den Implantaten nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen bzw. Reinigungsmethoden verbliebenen Bakterien; n.c. = Negativkontrolle, p.c. = Positivkontrolle, ne = in physiologische Kochsalzlösung eingebrachte Implantate, he = in Hinokitiol eingebrachte Implantate, ce = in Chlorhexidin eingebrachte Implantate, nr = mit physiologischer Kochsalzlösung mechanisch gereinigte Implantate, hr = mit Hinokitiol mechanisch gereinigte Implantate, cr = mit Chlorhexidin mechanisch gereinigte Implantate; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Positivkontrolle ($p=0,05$)

5. Diskussion

5.1. Auswahl kariogener und parodontalpathogener Bakterien

Als kariogene Bakterien wurden für die vorliegenden Untersuchungen *Streptococcus mutans* und *Actinomyces viscosus* ausgewählt. Insbesondere *Streptococcus mutans* spielt eine zentrale Rolle in der Kariesätiologie. Durch eine ausgeprägte Säureproduktion im Rahmen der Verstoffwechslung von Zucker verursacht dieses Bakterium in seiner Umgebung einen niedrigen pH-Wert, welcher zur Demineralisation der Zahnhartsubstanz und nachfolgend zur Entstehung von Karies beiträgt (43, 80). *Actinomyces viscosus* ist im Rahmen der dentalen Biofilmbildung ein bedeutender Primärbesiedler (80) und trägt außerdem zur Entstehung von Wurzelkaries bei (81, 82).

Als Vertreter der parodontalpathogenen Bakterien wurden *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium nucleatum* ausgewählt. Parodontopathogene Bakterien bewirken durch Aktivierung des Immunsystems des Wirts eine chronische Entzündung, wodurch es im Laufe der Zeit zu Gewebeerstörung und Knochenabbau kommt (43). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* verfügt über Fimbrien, die entscheidend für die bakterielle Adhäsionsfähigkeit sind. Bakterienspezies mit Fimbrien adhären drei- bis viermal besser an Oberflächen als Spezies ohne Fimbrien (83). Allerdings gibt es auch Experimente, die zeigen, dass Fimbrien zwar vorteilhaft, aber nicht zwingend notwendig für die Biofilmbildung von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sind (84). Für vorliegende Studie war die Adhärenz der Bakterien an den Implantaten ein wichtiger Faktor, da die Implantatoberflächen zunächst erfolgreich in vitro mit Bakterien kontaminiert werden mussten, um anschließend die Effektivität einer Reinigung der mit oralen Bakterien besiedelten Implantate mithilfe der Testsubstanzen überprüfen zu können.

Auch *Fusobacterium nucleatum* spielt eine ausschlaggebende Rolle in dentalen Biofilmen. Das Bakterium hat die Fähigkeit, Frühbesiedler wie z.B. *Streptococcus mutans* und Spätbesiedler wie *Porphyromonas gingivalis* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* miteinander zu verbinden (85, 86). *Porphyromonas gingivalis* bildet zusammen mit *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* den sog. roten Komplex, der eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Parodontitis spielt (87). Insbesondere die Intensität der parodontalen Infektion durch *Porphyromonas gingivalis* korreliert mit der klinischen Manifestation der parodontalen Gewebeerstörung (88).

5.2. Agardiffusionstests

5.2.1. Diskussion der Methode

In einem Review diskutieren Balouiri et al. (79) verschiedene Methoden, um die Wirksamkeit antimikrobieller Substanzen zu testen. In diesem Artikel werden u.a. der Agardiffusionstest sowie die Bouillonverdünnung und Agarverdünnungsmethoden als gängige Verfahren besprochen. Agardiffusionstests, die auch im Rahmen dieser Studie zum Einsatz kamen, wurden im Jahr 1940 erstmals beschrieben. Mit dieser Methode können Bakterienstämme qualitativ als empfindlich, mäßig empfindlich bzw. resistent gegenüber einer Substanz

kategorisiert werden. Weiterhin kommen sie zur Typisierung von Bakterien anhand ihres AntibioGRAMMs zum Einsatz. Vorteilhaft am Agardiffusionstest ist insbesondere, dass er einfach und kostengünstig durchführbar ist. Allerdings lassen Agardiffusionstests keine Unterscheidung der antibakteriellen Effekte in bakterizid bzw. bakterioStatisch zu, da die Hemmhofbildung nicht mit dem Zelltod der Bakterien gleichzusetzen ist (79). Eine Differenzierung zwischen bakterioStatisch und bakterizid ist beispielsweise mithilfe des *Time-kill Assays* möglich (79, 89). Inoue et al. führten *Time-kill Assays* an *Escherichia coli* durch und stellten fest, dass Hinokitiol in hohen Konzentrationen vermutlich bakterizid wirkt (44). Da jedoch von zahlreichen Faktoren, wie z.B. der getesteten Bakterienspezies, der Anzahl der Bakterien, den Umgebungsbedingungen und der Konzentration und Einwirkdauer der Testsubstanz, abhängt, ob eine Substanz bakterizid oder bakterioStatisch wirkt (89), sind weitere Untersuchungen nötig, um die Wirkungsweise von Hinokitiol genauer zu erforschen. Weiterhin kann, wie Balouiri et al. (79) beschreiben, mittels Agardiffusionstest keine genaue minimale Hemmkonzentration eines Stoffes bestimmt werden, da nicht feststeht, wie viel der zu testenden Substanz tatsächlich in das angrenzende Nährmedium diffundiert. Insgesamt werden Agardiffusionstests sehr häufig eingesetzt, um u.a. potentiell antimikrobiell wirksame Pflanzenextrakte oder essentielle Öle auf deren Wirksamkeit zu testen (79). Eine Standardisierung der Agardiffusionstests für bestimmte Bakterien hat u.a. das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) vorgenommen (69). Das Protokoll des EUCAST beinhaltet jedoch nicht die in vorliegender Studie getesteten Bakterienstämme *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis*. Daher musste die Inkubationszeit für die Agardiffusionstests mit diesen Bakterienstämmen im Rahmen von Vorversuchen individuell bestimmt werden. Für die Anaerobier musste zudem ein anderes Medium zum Einsatz kommen. Bavelaar et al. (90) untersuchten in einer Studie, ob der sogenannte *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) für Agardiffusionstests mit bestimmten schnell wachsenden Anaerobiern geeignet ist. Die Arbeitsgruppe kam zu einem positiven Ergebnis. Weiterhin empfehlen sie, das Inokulum bei Anaerobiern entsprechend McFarland-Standard 1,0 anstatt 0,5 zu kalibrieren. Deshalb wurden auch in vorliegender Studie für die Anaerobier FAA und Bakteriensuspensionen mit einem McFarland-Standard 1,0 verwendet (90).

5.2.2. Diskussion der Ergebnisse

Obwohl sich Hinokitiol aufgrund der kleineren Hemmhöfe im Agardiffusionstest als weniger effektiv als die Antibiotika Penicillin-G, Metronidazol und Amoxicillin zeigte, ist dennoch eine grundsätzliche antibakterielle Wirksamkeit dieser Substanz gegenüber den getesteten oralpathogenen Bakterien, insbesondere für *Streptococcus mutans* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bereits in relativ niedrigen Konzentrationen anzunehmen. Für *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* erzeugte Hinokitiol jedoch erst in höheren Konzentrationen einen Hemmhof. Da Domon et al. ab einer Konzentration von 3 mM eine geringe, jedoch signifikante Abnahme der Zellviabilität für humane Gingivaepithelzellen und Gingivafibroblasten feststellten (43), ist die

Hemmhofbildung bei höheren Konzentrationen eventuell auf bakterizide Effekte von Hinokitiol zurückzuführen. Allerdings sind die Wirkstoffkonzentrationen nicht direkt miteinander vergleichbar, da wie bereits erwähnt bei Agardiffusionstests die tatsächlich in den Agar diffundierte Wirkstoffmenge unbekannt bleibt (79).

Durch Zinkchlorid wurde in vorliegender Untersuchung bei keinem der Bakterienstämme ein Hemmhof in den verschiedenen getesteten Konzentrationen induziert. Bei Kombinationen aus Hinokitiol und Zinkchlorid entsprach die Hemmhofgröße jeweils der durch den Hinokitiolgehalt allein erzeugten Größe. Für Zinkchlorid konnte somit keine eigene antibakterielle Wirkung beobachtet werden.

In der Literatur wird die antibakterielle Wirkung von Zink kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen, dass Zink effektiv gegen oralpathogene Bakterien wirkt. So auch eine Untersuchung von Kang et al., bei der mittels direktem Expositionstest eine antibakterielle Wirkung von Zinkchlorid u.a. auf *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* festgestellt wurde (61). Auch ein Review zur antibakteriellen Aktivität von Zink gegenüber *Streptococcus mutans* postuliert, dass Zink wirksam gegen *Streptococcus mutans* ist. Die Effektivität scheint jedoch abhängig von der verwendeten Zinkverbindung und der Konzentration zu sein (91). Laut Almoudi et al. (91) existieren nur wenige Studien, die Agardiffusionstests benutzen, um diese Fragestellung zu klären. Vier davon wurden in den Review der Arbeitsgruppe von Almoudi et al. näher analysiert, wobei unterschiedliche Zinkverbindungen im Agardiffusionstest keine bis lediglich moderat ausgedehnte Hemmhöfe induzierten (91). Ein weiterer systematischer Review von Griaudzkyte und Jagelaviciene (92), der die antibakterielle Wirksamkeit von Zink bestätigt, beinhaltet auch drei Studien (93-95), die die Wirksamkeit von Zink gegenüber oralpathogenen Bakterien u.a. anhand von Agardiffusionstests untersuchen und von einer durch Zink verursachten Hemmhofbildung berichten.

Spacciapoli et al. (64) untersuchten anhand von in-vitro-Experimenten die antibakterielle Wirksamkeit von Silbernitrat, Kupferchlorid und Zinkchlorid auf verschiedene oralpathogene Bakterien. Zinkchlorid wurde an *Porphyromonas gingivalis* getestet und zeigte auch in der höchsten in den Versuchen verwendeten Konzentration (50 µg/ml) keine antibakterielle Wirksamkeit (64).

Unterschiedliche Gründe könnten die widersprüchlichen Beobachtungen erklären. He et al. beschreiben, dass Mischkulturen unterschiedlicher Bakterien empfindlicher gegenüber mittleren Zink-Konzentrationen (200-300 µM) sind als Monokulturen (62). Dass in vorliegender Studie Agardiffusionstests mit Monokulturen durchgeführt wurden, könnte eine Ursache dafür sein, dass keine antibakterielle Wirksamkeit von Zinkchlorid festgestellt wurde. Außerdem reagieren dicht aneinander liegende Bakterenschichten nach He et al. (62) teilweise vollständig unempfindlich gegenüber Zink, da dichte Zellverbände von Zinkionen eventuell nicht durchdrungen werden können. Biofilme reagieren somit anders auf Zink als planktonisch wachsende Bakterien in Suspension (62).

Weiterhin ist denkbar, dass im Sinne des Publikationsbias viele Untersuchungen, die zu einem negativen Ergebnis gekommen sind, nicht veröffentlicht wurden (96).

Ein weiterer möglicher Grund dafür, dass in vorliegender Studie keine antibakterielle Wirksamkeit von Zink nachgewiesen werden konnte, besteht darin, dass die verwendete Zinkverbindung ggf. nicht in ausreichendem Umfang in den Agar diffundiert ist. Allerdings wurde die Zinkchlorid-Lösung mit DMSO hergestellt, das als potentes Lösungsmittel gilt (97, 98).

Die in vorliegender Studie getestete fertige Zubereitung einer Mundspüllösung erzeugte unverdünnt bei allen getesteten Bakterien einen Hemmhof, für *Streptococcus mutans* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auch in zehnprozentiger Lösung. Weiterhin induzierte die Mundspüllösung auch bei Agardiffusionstests mit Bakterien, bei denen reines Hinokitiol auch in hoher Konzentration keinen Hemmhof erzeugte, einen deutlichen Hemmhof (z.B. bei *Actinomyces viscosus* und *Fusobacterium nucleatum*). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die fertige Zubereitung der Mundspüllösung noch weitere antibakteriell wirksame Bestandteile enthält, beispielsweise Zinkchlorid. Bei vorliegenden Tests erwies sich Zinkchlorid jedoch nicht als wirksam. In einer Studie von Wang et al. wurde nur bei bestimmten Konzentrationen von Hinokitiol und Zinkoxid ein synergistischer antibakterieller Effekt der beiden Substanzen beobachtet (42). Möglicherweise ist also ein bestimmtes Konzentrationsverhältnis von Hinokitiol und Zinkchlorid nötig, um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen. Außerdem könnten auch andere in der fertigen Zubereitung enthaltene Substanzen ursächlich für deren scheinbar gesteigerte antibakterielle Wirkung sein. Hierfür in Frage kommen beispielsweise Eukalyptusöl und Zitronensäure. Eukalyptusöl wird aus Blättern von Eukalyptusbäumen (*Eucalyptus globulus*) gewonnen und besitzt eine eigene antibakterielle Wirkung. Im Gegensatz zu anderen essentiellen Ölen ist Eukalyptusöl wirksamer gegen gramnegative als gegen grampositive Bakterien (99).

Auch für Zitronensäure wurde eine antibakterielle Wirkung postuliert, wodurch unter anderem die Proliferation von oralen Biofilmen gehemmt werden kann (100). Durch einen niedrigen pH-Wert schafft Zitronensäure extrazellulär eine saure Umgebung, was eine veränderte Durchlässigkeit der Zellmembran und ungünstige Wachstumsbedingungen für einige Bakterien verursacht (101).

5.2.2.1. Paradoxes Inhibitionsphänomen

In vorliegender Studie trat bei Agardiffusionstests für *Streptococcus mutans* bei Testung von Hinokitiol 2500 µM das Paradoxe Inhibitionsphänomen auf. Der Begriff *Paradoxes Inhibitionsphänomen* (PIP), auch *Paradoxe Wachstumseffekt* oder nach dem Erstbeschreiber Harry Eagle *Eagle Effect* (102) genannt, beschreibt, dass ein antimikrobieller Wirkstoff in niedrigen Konzentrationen effektiver gegen Bakterien oder Pilze ist als in höheren Konzentrationen (103-106). Das Paradoxe Inhibitionsphänomen tritt bei vielen verschiedenen Bakterien und Pilzen sowie bei unterschiedlichen antibakteriellen Wirkstoffen auf (106, 107) und scheint daher eine Überlebensstrategie für die Mikroorganismen

darzustellen (106). Die konkreten Ursachen dieses Phänomens konnten bislang noch nicht abschließend geklärt werden (105-108). Als ein möglicher dem PIP zugrunde liegender Mechanismus wird die Interferenz von Antibiotika in hohen Konzentrationen mit bakteriellen Autolysinen beschrieben (105). Autolysine sind Murein-Hydrolasen, die bakterielle Zellwandbestandteile zersetzen (106). Sie sind beispielsweise für das bakterielle Zellwachstum von Bedeutung, da sie Zwischenräume in der Peptidoglykanmatrix schaffen, in die neue Peptidoglykane eingefügt werden können.

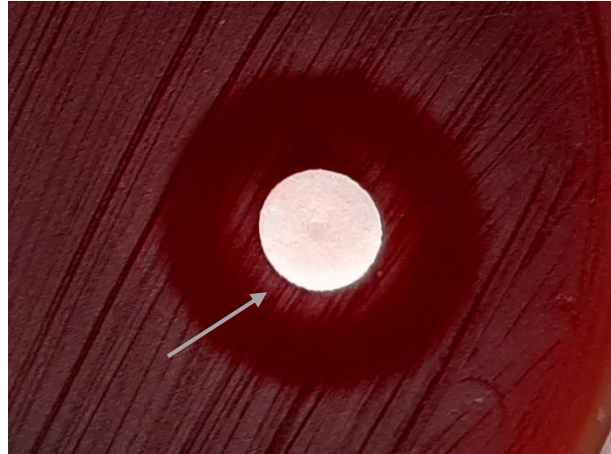


Abbildung 52: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*. Das Paradoxe Inhibitionsphänomen imponiert als ringförmiger Bakterienrasen (siehe Pfeil) innerhalb des Hemmhofs in unmittelbarer Umgebung des mit Hinokitiol 2500 μM imprägnierten Wirkstoffträgers.

Außerdem sind sie wichtig für die Trennung der Tochterzellen während der Zellteilung (109). Autolysine stellen allerdings aufgrund ihrer Fähigkeit die Zellwand zu hydrolysieren für die Bakterien auch eine Gefahr dar. Beta-Lactam-Antibiotika unterbinden die Quervernetzung von Peptidoglykanen der bakteriellen Zellwand und bewirken zudem die Zellyse durch Aktivierung von bakteriellen Autolysinen (109). Durch hohe Konzentrationen eines Antibiotikums scheint jedoch die Funktion der Autolysine unter Umständen beeinträchtigt zu werden, wodurch die Lyse der Bakterien behindert wird und somit die Bakterien paradoxerweise weniger sensibel auf den Wirkstoff in hoher Konzentration als in niedriger Konzentration reagieren (106, 110). Shih et al. (46) testeten u.a. *Streptococcus mutans* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf ihre Autolysinaktivität. Sowohl bei *Streptococcus mutans* als auch bei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stellten sie eine im Vergleich zu anderen Bakterienspezies geringe Aktivität der Autolysine fest. Eine niedrige Autolysinaktivität wiederum ist mit dem PIP assoziiert. Shih et al. testeten Hinokitiol mittels Agardiffusionstests auf antibakterielle Wirksamkeit gegenüber *Streptococcus mutans* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Im Agardiffusionstest trat bei Konzentrationen von Hinokitiol 3,125 μg und 12,5 μg das PIP auf. Es imponierte als ringförmiger Bakterienrasen im Inneren des Hemmhofs, nahe des mit Hinokitiol imprägnierten Plättchens (46). In vorliegender Studie konnte das PIP bei *Streptococcus mutans* beobachtet werden. Bei Wirkstoffträgern, die mit Hinokitiol in einer Konzentration von 2500 μM imprägniert waren, was absolut einer Menge von ca. 8,21 μg Hinokitiol entspricht, zeigte sich im Agardiffusionstest ein ringförmiger Bakterienrasen innerhalb des Hemmhofs in unmittelbarer Umgebung des Hinokitiol-Plättchens (Abb. 52). Bei *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* trat das PIP jedoch nicht auf. Ein möglicher Grund dafür besteht in der Verwendung eines anderen Bakterienstamms von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. In der Untersuchung von Shih et al. tritt bei Erhöhung der Hinokitiol-Konzentration über diejenigen Konzentrationen hinaus, bei denen

das PIP auftritt, erneut eine Hemmung des Bakterienwachstums auf (46). In vorliegender Studie war die Konzentration, bei der das PIP auftrat, gleichzeitig die höchste Hinokitiol-Konzentration, die für *Streptococcus mutans* getestet wurde. Eine erneute Hemmung des Bakterienwachstums bei höheren Konzentrationen steht nicht in Einklang mit der Theorie, dass die Autolysine durch die höhere Konzentration des antibakteriellen Wirkstoffes verstärkt gehemmt werden und dadurch die Effektivität des Wirkstoffs schmälern. Eine erneute Hemmung des bakteriellen Wachstums durch noch höhere Konzentrationen wird allerdings auch in anderen Studien beschrieben. Vanstraelen et al. berichten von einer erneuten Hemmung des Wachstums von Pilzen bei weiterer Steigerung der Konzentration eines Antibiotikums über diejenige Konzentration hinaus, bei der im Zuge des PIPs nur eine geringere Hemmung auftritt (111).

5.2.2.2. MICs und Hemmhofgrößen von Hinokitiol gegenüber oralpathogenen Bakterien

Die antibakteriellen Wirkungen von Hinokitiol auf oralpathogene Bakterien wurden in zahlreichen früheren Studien postuliert (42, 43, 46). Die dabei ermittelten MICs und Hemmhofgrößen bei definierten Konzentrationen des Wirkstoffs weichen jedoch zwischen den einzelnen Studien zum Teil deutlich voneinander ab. Beispielsweise ermittelten Domon et al. u.a. folgende MICs: *Streptococcus mutans* (0,3 µg/ml), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (0,5 µg/ml), *Porphyromonas gingivalis* (1,0 µg/ml) und *Fusobacterium nucleatum* (50 µg/ml) (43). Shih et al. hingegen geben eine knapp 40-mal höhere MIC für *Streptococcus mutans* (70 µM bzw. 11,5 µg/ml) und eine 30-fach höhere MIC für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (90 µM bzw. 14,8 µg/ml) an (43, 46). Wang et al. berichten von MICs in Höhe von 243,6 µM (entsprechend 40 µg/ml) sowohl für *Streptococcus mutans* als auch für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (42, 43), womit die Werte ca. 133-mal (*Streptococcus mutans*) bzw. 80-mal (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) höher ausfallen als bei Domon et al (43). Die MICs für drei verschiedene Stämme von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, die von der Arbeitsgruppe um Osawa et al. untersucht wurden, liegen zwischen 39 und 156 µg/ml ((112) zitiert nach (43)) (43).

Shih et al. (46) und Wang et al. (42) untersuchten die antibakterielle Wirkung von Hinokitiol u.a. gegenüber *Streptococcus mutans* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auch mittels Agardiffusionstests. Wang et al. erzielten in Agardiffusionstests bei beiden Bakterienstämmen Hemmhöfe von ca. 4 cm Durchmesser um die mit 500 µM Hinokitiol imprägnierten, 6 mm großen Testplättchen (42). In vorliegender Studie entstanden bei Hinokitiol gleicher Konzentration Hemmhöfe in einer Größe von durchschnittlich 9,1 mm für *Streptococcus mutans* und 9,3 mm für *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Die bei Shih et al. in Agardiffusionstests mit *Streptococcus mutans* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* entstandenen Hemmhöfe waren bei Applikation von 0,375 µg bis 50 µg Hinokitiol auf die Wirkstoffträger zwischen 6,5 mm und 22,0 mm groß (46) (Tabelle 7).

Die in verschiedenen Studien erzielten Hemmhofgrößen sind jedoch nur sehr eingeschränkt miteinander vergleichbar. Unter anderem die Dicke der Agarplatten und die Bakteriendichte der verwendeten Suspension beeinflussen die Hemmhofgrößen. Bei den Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Shih (46) und Wang (42) erfolgte zudem keine Kalibrierung der Bakteriensuspension entsprechend McFarland Standard.

Weitere Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse der einzelnen Studien bestehen in der Verwendung verschiedener Bakterienstämme und Medien, dem Einsatz von Hinokitiol unterschiedlicher Hersteller sowie der unterschiedlichen lichtinduzierten Inaktivierung des Hinokitiols durch eine unkontrollierte Lichtexposition (43). Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der Studien ist außerdem zu beachten, dass die Ergebnisse von Agardiffusionstests nicht direkt mit MIC-Werten vergleichbar sind, da nicht feststellbar ist, wie viel Wirkstoff genau in den Agar diffundiert ist (79).

Tabelle 7: MICs und Hemmhofgrößen von Hinokitiol gegenüber oralpathogenen Bakterien diverser Studien

Studie	Bakterien	MICs	Agardiffusionstest	
			Hk-Konzentration	Hemmhofgröße [mm]
Domon et al. (43)	S. mutans	0,3 µg/ml (1,8 µM)		
	A. actinomycetemcomitans	0,5 µg/ml (3,0 µM)		
	P. gingivalis	1,0 µg/ml (6,1 µM)		
	F. nucleatum	50 µg/ml (304,5 µM)		
Shih et al. (46)	S. mutans	70 µM (11,5 µg/ml)	0,375 µg (ca. 114 µM)	ca. 6,5
			0,75 µg (ca. 228 µM)	ca. 6,5
			1,5 µg (ca. 457 µM)	ca. 8,0
			3,125 µg (ca. 952 µM)	ca. 9,5
			6,25 µg (ca. 1903 µM)	ca. 12,0
			12,5 µg (ca. 3806 µM)	ca. 14,5
			25 µg (ca. 7613 µM)	ca. 16,0
	50 µg (ca. 15225 µM)	ca. 22,0		
	A. actinomycetemcomitans	90 µM (14,8 µg/ml)	0,375 µg	ca. 7,0
			0,75 µg	ca. 8,5
			1,5 µg	ca. 11,0
			3,125 µg	ca. 12,5
			6,25 µg	ca. 14,0
			12,5 µg	ca. 16,0
25 µg			ca. 18,5	
50 µg	ca. 22,0			
		*	**	

Wang et al. (42)	S. mutans A. actinomycetemcomitans	243,6 μ M (40 μ g/ml) 243,6 μ M (40 μ g/ml)	500 μ M	ca. 40 (A.a. etwas größer als S.m.)**
Osawa et al. (112), zitiert nach Domon et al. (43)	A. actinomycetemcomitans (3 Stämme)	237,5-950,1 μ M (39-156 μ g/ml)		
Vorliegende Studie	S. mutans A. actinomycetemcomitans A. viscosus F. nucleatum P. gingivalis		20 μ M 100 μ M 500 μ M 2500 μ M 20 μ M 100 μ M 500 μ M 2500 μ M 5 mM 10 mM 20 mM 40 mM 5 mM 10 mM 20 mM 40 mM 5 mM 10 mM 20 mM 40 mM	0,0 0,0 9,1 16,0 0,0 0,0 9,3 16,4 0,0 0,0 15,6 24,0 0,0 0,0 9,3 13,5 12,8 15,4 18,9 24,6

**Shih et al. (46) geben an, dass ein Filterpapierplättchen je einen Tropfen DMSO mit der jeweils angegebenen Menge Hinokitiol enthält; zur besseren Vergleichbarkeit der Werte wurden die Angaben (Mikrogramm Hinokitiol pro Tropfen DMSO bzw. Plättchen) in vorliegender Ausführung in die Einheit Mikromol pro Liter bzw. Mikromolar (μ M) umgerechnet. Da es sich bei Tropfen jedoch nicht um eine SI-Einheit handelt, musste die Tropfengröße abgeschätzt werden. Wenn man von einer ähnlichen Saugfähigkeit der verwendeten Filterpapierplättchen ausgeht, ist eine Saugfähigkeit von 20 μ l pro Plättchen plausibel. Die Tropfengröße wurde daher zur Umrechnung auf 20 μ l geschätzt.*

***Die Hemmhofgrößen können nur als arbiträre Werte angegeben werden, da sie aus Diagrammen abgelesen wurden (keine Absolutwerte im jeweiligen Artikel aufgeführt).*

5.3. In-vitro-(De-)Kontamination von Titanimplantaten

5.3.1. Diskussion der Methoden

5.3.1.1. Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Analysen sind geeignet, um Bakterien auf verschiedenen Oberflächen wie Implantaten oder Zähnen qualitativ zu beschreiben und zu visualisieren (113-116). Kammoun et al. beschreiben diese Methode als Goldstandard für die Beurteilung von Bakterien hinsichtlich Dichte und Morphologie (115). Die Rasterelektronenmikroskopie wurde insbesondere auch für die qualitative Prüfung von Titanoberflächen nach Reinigung mit antibakteriellen Substanzen herangezogen (117, 118). In der Regel erfolgt neben einer qualitativen Analyse des Biofilms bzw. der adhärierenden Bakterien auch eine quantitative. Hierfür kommen verschiedene Methoden in Frage, beispielsweise kolorimetrische Assays wie XTT und MTT, die die Stoffwechselaktivität von Bakterien messen (118, 119), die quantitative PCR (120), die mikrobiellen Kulturanalysen (117) oder auf ATP-Gehalt und Lumineszenzmessung basierende Verfahren wie der BacTiter-Glo (121).

5.3.1.2. Zellviabilitäts-Assay „BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay“

Vorteile der Anwendung des BacTiter-Glo in vorliegender Studie sind seine hohe Sensitivität und einfache Durchführbarkeit. Außerdem zeigt das Verfahren einen großen linearen Arbeitsbereich (122), in dem direkte Proportionalität zwischen Lumineszenzsignal und Bakterienkonzentration besteht. Diese Proportionalität ermöglicht Messungen ausreichender Genauigkeit (123). Die hohen Kosten stellen den wesentlichen Nachteil dieser Methode dar (122).

Mittels BacTiter-Glo konnte keine differentielle Quantifizierung der Bakterien auf dem koronalen glatten Teil und rauen Gewindeanteil der Implantate erfolgen. Hierfür müssten beispielsweise Titanplättchen mit entsprechenden Oberflächenstrukturen verwendet werden, um die Menge der auf den verschiedenen Flächen adhärierenden Bakterien vergleichen zu können. In vorliegender Studie wurden lediglich bei der qualitativen Analyse die glatten und rauen Implantatoberflächen gegenübergestellt. Dabei wurde jedoch kein charakteristisches Muster der Bakterienadhärenz in Abhängigkeit von der Ultrastruktur der Implantatoberfläche angetroffen.

5.3.1.3. Bakterielle Kontamination der Implantatoberflächen

Um die Bedingungen im oralen Milieu möglichst realistisch widerzuspiegeln, wurden die Implantate in vorliegender Untersuchung zunächst in natürlichem Speichel inkubiert. Dieser wurde nicht sterilisiert. Auf allen Strukturen im Mund – egal ob künstlich, wie z.B. Implantate, oder natürlich (beispielsweise Zähne) – bildet sich innerhalb kurzer Zeit das sog. erworbene Pellikel, das v.a. aus Speichelproteinen besteht. Einerseits beinhaltet es antibakterielle Komponenten wie Lysozym und wirkt somit der bakteriellen Besiedlung entgegen, andererseits erleichtert es gleichzeitig durch verschiedene Liganden für bakterielle

Adhäsine (z.B. Glykolipide und Fibrinogen) die Bindung von Frühbesiedlern wie Streptokokken und damit die initiale Biofilmbildung (124). Die bakterielle Mischflora, die durch den Speichel entsteht, bildet die natürliche Umgebung des Implantats in der Mundhöhle besser ab als bei Verwendung einer mikrobiellen Monokultur. Elias et al. kritisieren, dass viele Studien Monokulturen untersuchen, obwohl in vivo vorkommende Biofilme meist aus vielen verschiedenen Bakterienspezies bestehen (38). Zusätzlich zu der Mischkultur, die durch den Speichel entstanden ist, sollte mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ein Bakterium auf den Implantaten angezüchtet werden, das im Rahmen von periimplantären Erkrankungen häufig vorkommt und zugleich ein erhebliches krankmachendes Potential hat (29). Die Implantate wurden drei Wochen lang in Flüssigkultur mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* eingebracht. In früheren Studien mit ähnlichen Versuchen an in vitro etabliertem Biofilm bzw. an bakteriell besiedelten Oberflächen wurden kürzere Inkubationszeiten gewählt. Dhaliwal et al. (125) nahmen in einen Review über die Reinigung von Dentalimplantaten u.a. acht Artikel (126-130) auf, die Versuche beschreiben, bei denen in vitro ein Biofilm mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* auf Titanmaterialien angezüchtet wurde. Die Inkubationszeit betrug hier zwischen 24 Stunden und sechs Tagen (125). Im Rahmen vorliegender Studie wurden ebenfalls mehrere Vorversuche mit kürzeren Inkubationszeiten durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopischen Bilder zeigten jedoch, dass in dieser Zeit nur sehr wenig Bakterienwachstum auf den Implantatoberflächen stattgefunden hat. Die anschließend gewählte, relativ lange Inkubationszeit hätte die Ausbildung eines mehrschichtigen, reifen Biofilms begünstigen können (131). Dass die Versuche mit Implantaten durchgeführt wurden, die im Vergleich zu einem reifen Biofilm mit extrazellulärer Matrix lediglich mit mehr oder weniger dicht gepackten Bakterien besiedelt waren, stellt eine Limitation der Studie dar, da die Durchführung der Experimente mit reifem Biofilm mit mehreren Schichten verschiedener Bakterien im Verbund mit extrazellulärer Matrix der Situation in vivo nähergekommen wäre. Es ist davon auszugehen, dass die Bakterien im engen Verband eines Biofilms insgesamt weniger empfindlich auf die Reinigung mit antimikrobiellen Substanzen reagieren würden (131, 132).

5.3.1.4. Substanzen und Methoden zur Reinigung der Implantatoberflächen

Zur Reinigung der Implantate kamen Chlorhexidin 0,2 % als in der Zahnmedizin häufig verwendetes Antiseptikum, Hinokitiol 20 mM als Testsubstanz und Natriumchloridlösung 0,9 % als mikrobiologisch unwirksame Flüssigkeit zum Einsatz. Chlorhexidin wurde ausgewählt, da es als Goldstandard für orale Antiseptika gilt (133). Wie Hinokitiol wirkt auch Chlorhexidin an der bakteriellen Zellwand. In Konzentrationen > 0,1 % verursacht Chlorhexidin die Zellyse (134). Das Bisbiguanid zeichnet sich durch ein äußerst breites Wirkspektrum aus (135, 136). Unter anderem ist Chlorhexidin gegen parodontalpathogene Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wirksam (137). Das Antiseptikum kann jedoch auch Nebenwirkungen wie zum Beispiel Zahnverfärbungen, erhöhte Bildung von Zahnstein,

Xerostomie sowie in seltenen Fällen auch schwere allergische Reaktionen verursachen und bei häufiger Anwendung die Ausbildung von Resistenzen fördern (134). Zudem könnte durch die Verwendung von Chlorhexidin als Mundspüllösung die Diversität des oralen Mikrobioms geschmälert und dadurch wiederum eine Dysbiose begünstigt werden (137, 138).

Physiologische Kochsalzlösung wurde neben nicht bakteriell kontaminierten Implantaten als weitere negative Kontrolle verwendet.

Die Behandlung der Implantate mit den verschiedenen Testsubstanzen erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. Einerseits wurden die Implantatoberflächen manuell mit einem mit der jeweiligen Substanz versehenen Schaumstoffpellet 60 Sekunden lang gereinigt. Dieses Verfahren wurde ausgewählt, da es dem üblichen klinischen Vorgehen entspricht. Außerdem sollte untersucht werden, inwiefern eine mechanische Reinigung Einfluss auf die antibakterielle Wirkung hat. Die Reinigung wurde stets von der gleichen Person durchgeführt. Dennoch könnten unwillkürliche Schwankungen des Anpressdrucks des Schaumstoffpellets, die ohne Messung des Drucks nicht ausgeschlossen werden können, das Ergebnis beeinflussen haben. Laut Dostie et al. ist die einwirkende mechanische Kraft ausschlaggebend für die Entfernung eines Biofilms (139). In vorliegender Studie zeigte sich jedoch insgesamt keine Überlegenheit der mechanischen Reinigungsmethode gegenüber dem Einbringen der Implantate in die jeweiligen Flüssigkeiten hinsichtlich der Anzahl der von der Implantatoberfläche entfernten Bakterien, was die Schlussfolgerung zulässt, dass geringe Schwankungen des Anpressdrucks das Ergebnis nicht signifikant beeinflussen haben dürften. Um jedoch den Einfluss der applizierten mechanischen Kraft genau zu bestimmen, müsste für die verschiedenen Behandlungsmethoden die gleiche Behandlungsdauer gewählt werden und der Anpressdruck gemessen werden.

Das zweistündige Einbringen der Implantate auf einem Schwenkgerät konnte die Exposition über einen längeren Zeitraum testen. Domon et al. stellten bei einer einstündigen Einwirkzeit von Hinokitiol einen bakteriziden Effekt gegenüber mehreren oralpathogenen Bakterien fest (43). Daher wurde ein Zeitraum von mehr als einer Stunde gewählt.

5.3.2. Diskussion der Ergebnisse

5.3.2.1. Rasterelektronenmikroskopie

Auf den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind kleine, kokkenförmige Bakterien sichtbar. In nativen oralen Biofilmen finden sich als typische Kokken u.a. Streptokokken, Neisserien und Veillonellen. Ihr Durchmesser beträgt ca. 0,5-2,0 µm (140). Bei Vertretern des Bakterienstamms *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* handelt es sich um Kokkobazillen, sie sind also leicht oval geformt. Da die Implantate in eine Mischkultur eingebracht waren (Speichel und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), lässt sich nicht abschließend feststellen, um welche Bakterien es sich auf den Bildern handelt. Von Standar im Rahmen einer Dissertation veröffentlichte REM-Bilder von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* – ebenfalls DSMZ 11123 (141) – ähneln jedoch den Bakterien auf den REM-Bildern der vorliegenden Studie.

Insgesamt spiegeln die REM-Bilder die Ergebnisse des Zellviabilitätsassays wider. Lediglich beim Vergleich der REM-Bilder des in Hinokitiol eingebrachten Implantats (Abbildungen 27-30) mit denen des mechanisch mit Hinokitiol behandelten Implantats (Abbildungen 39-42) fällt auf, dass bei den manuell behandelten Implantatoberflächen etwas weniger Bakterien anhaften. Der Zellviabilitätsassay ergab dagegen einen etwas höheren Lumineszenzwert bei den mit Hinokitiol manuell gereinigten Implantaten (1020) als bei den in die Substanz eingebrachten (932). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Beim quantitativen Vergleich der Bakterien auf der glatten und rauhen Oberfläche der Implantate ergibt sich kein einheitliches Bild. In einigen Versuchsgruppen scheinen mehr Bakterien im glatten, cervikalen Anteil der Implantate, bei anderen im raueren Gewindebereich verblieben zu sein. Die Literatur ist sich hinsichtlich des Einflusses der Rauheit von Titanoberflächen auf die Adhärenz von Bakterien uneins. Einige Studien gehen davon aus, dass die detaillierte Oberflächenmorphologie bzw. dreidimensionale Mikrotopographie entscheidender ist als der Mittenrauwert eines Objekts (132, 142). Die Mikrotopographie beschreibt die Geometrie und Anordnung der Kavitäten und Erhebungen und sonstiger Strukturen auf einer Oberfläche. Die Bakterien streben bei der Adhäsion nach einer möglichst großen Kontaktfläche mit der Oberfläche und lagern sich dementsprechend insbesondere in topografische Strukturen bzw. Kavitäten in der Größenordnung der Bakterien selbst ein (33). Die in vorliegender Studie verwendeten 3iT3-Implantate von Biomet weisen laut Hersteller sowohl im cervikalen Bereich als auch in der Gewinderegion die gleiche Fein-Mikro-Topografie mit Vorsprüngen zwischen ein und drei Mikrometern und Sub-Mikro-Topografie mit 0,01 μm - 0,1 μm großen Vorsprüngen auf. Die Ultrastruktur der beiden Bereiche unterscheidet sich lediglich im Vorhandensein der Grob-Mikro-Topografie, die ausschließlich im Gewindeanteil der Implantate zusätzlich zur Fein- und Sub-Mikro-Topografie vorliegt. Somit unterscheidet sich zwar der Rauheitswert zwischen zervikalem Anteil ($S_a \approx 0,5 \mu\text{m}$) und Gewinderegion ($S_a \approx 1,4 \mu\text{m}$) der Implantate (76), die detaillierte, feine Mikrostruktur, die für die bakterielle Adhärenz mitunter ausschlaggebend zu sein scheint, jedoch nicht. Dies könnte erklären, weshalb sich kein klares Muster hinsichtlich der Menge der adhärierenden Bakterien im glatten bzw. rauhen Anteil der Implantate zeigt.

Eine Limitation der vorliegenden Studie besteht darin, dass bei der Anfertigung der Bilder am Rasterelektronenmikroskop nur jeweils eine Versuchsprobe betrachtet wurde. Allerdings dienen die Bilder primär dazu, einen qualitativen, visuellen Eindruck der Bakterien auf den Implantatoberflächen zu generieren. Eine quantitative Analyse erfolgte mittels BacTiter-Glo. Hierbei betrug die Gruppengröße $n=4$.

5.3.2.2. *Quantifizierung der auf den Implantaten verbliebenen Bakterien mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay*

Chlorhexidin wirkte effektiver gegen die Bakterien auf den Implantaten als Hinokitiol. Die Behandlung mit Kochsalzlösung, die neben den nicht mit Bakterien kontaminierten Implantaten als weitere negative Kontrolle diente, entfernte am wenigsten Bakterien, da sie nur durch den mechanischen Abtrag wirkte. Die nach Behandlung mit den drei verschiedenen Substanzen verbliebene Menge an Bakterien unterscheidet sich zwischen den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen (bei Verwendung verschiedener Substanzen) signifikant voneinander. Lediglich die manuelle Reinigung mit Hinokitiol entfernte nicht mehr Bakterien von den Implantaten als das Einbringen in Kochsalzlösung.

Ein Vergleich der auf den Implantaten verbliebenen Anzahl an Bakterien nach mechanischer Reinigung oder Einbringen in die gleiche Substanz ergab in vorliegender Studie keine signifikanten Unterschiede, mit Ausnahme von Chlorhexidin. Die manuelle Reinigung der Implantatoberflächen mit Chlorhexidin entfernte mehr Bakterien als die einfache Exposition im jeweiligen Medium. Im Gegensatz zu vorliegender Untersuchung, bei der die Stärke der Reduktion der Bakterien auf den Implantaten in erster Linie vom verwendeten Wirkstoff und nicht von der Reinigungsmethode abhing, beschreibt eine Studie von Dostie et al. (139), dass der mechanische Effekt der Reinigung für die Bakterienreduktion auf Titanoberflächen der ausschlaggebende Faktor ist. Titanplättchen wurden drei Wochen mit dentaler Plaque anaerob inkubiert, um einen Biofilm anzuzüchten. Anschließend erfolgte die experimentelle Reinigung der Prüfkörper durch Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung oder unterschiedlichen chemischen Wirkstoffen, u.a. Chlorhexidin, für zwei Minuten. Insgesamt zeigte sich in dieser Studie, dass primär die mechanische Kraft, die beim Spülen auf die Prüfkörper einwirkt, nicht der chemische Effekt der verwendeten Antiseptika, die Entfernung der Bakterien bewirkt (139). In einer weiteren Studie zur Reinigung von Titanoberflächen von Zablotzky et al. (143) wurden zunächst die Versuchsproben mit Lipopolysaccharid (LPS) kontaminiert und anschließend verschiedene Reinigungsverfahren getestet. Eine einminütige Reinigung mit einem in Kochsalzlösung getränktem Wattepellet bewirkte eine im Vergleich zur unbehandelten Positivkontrolle signifikante Reduktion der Menge an LPS auf der Oberfläche der Titanprüfkörper. Zudem konnte durch die Behandlung mit Chlorhexidin versehenen Wattepellets nicht signifikant mehr LPS reduziert werden als mit einer einfachen Kochsalzlösung (143). Die mechanische Reinigung scheint hier also auch ohne antimikrobiell wirksame Substanz einen Effekt zu erzielen. Eine Behandlung mit Kochsalzlösung bewirkte auch in vorliegender Studie eine Reduktion der Bakterien auf den Implantaten, jedoch in meist deutlich geringerem Umfang als die mikrobiologisch wirksamen Substanzen.

Andere Studien bestätigen, dass verschiedene Antiseptika eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Wirkung zur Reinigung von bakteriell besiedelten dentalen Implantaten aufweisen. Im Rahmen einer Untersuchung von Gosau et al. (144)

wurden in vivo mikrobielle Biofilme auf Titanoberflächen angezüchtet. Anschließend wurden die Proben eine Minute lang in verschiedene Lösungen, u.a. Chlorhexidin 0,2%, eingebracht, um die Bakterien von den Prüfkörperoberflächen zu entfernen. Abgesehen von Ausnahmen verblieben statistisch signifikant weniger Bakterien auf den Versuchsproben, die mit den verschiedenen Antiseptika behandelt wurden, als in der negativen Kontrollgruppe (144). Eine weitere Studie zur Reinigung von Implantaten von Kotsakis et al. (145) berichtet, dass alle getesteten Antiseptika die bakterielle Besiedlung auf den Titanplättchen effektiver reduzierten als reine Kochsalzlösung. Die Reinigung der Versuchsproben erfolgte jeweils mit einem mit den verschiedenen Substanzen getränkten Wattepellet (145). Auch Bürgers et al. (146) untersuchten die Wirksamkeit verschiedener Antiseptika auf Titanoberflächen, wobei die Prüfkörper jeweils eine Minute lang in den Lösungen zur Reinigung inkubiert wurden. Die Wirksamkeit der Antiseptika hing von den Bakterien ab. Kein Antiseptikum erwies sich als einheitlich wirksam gegenüber allen drei verwendeten Bakterienspezies (146). Die drei beschriebenen Studien sind auch Teil einer systematischen Übersichtsarbeit von Patil et al. (147), die untersuchte, welche chemische Substanz am besten zur Reinigung von Implantaten geeignet ist, unter Beachtung des Aspekts, ob eine zusätzliche mechanische Reinigung das Resultat beeinflusst. Die Autoren schlossen fünf Studien in diesen systematischen Review ein und kommen insgesamt zum Ergebnis, dass vorerst noch unzureichende Daten zur Klärung dieser Fragestellung verfügbar sind und daher zum aktuellen Zeitpunkt keine endgültige Antwort gegeben werden kann (147).

Um abschließend festzustellen, wie groß der Einfluss verschiedener Methoden auf den Erfolg der Reinigung ist, sind weitere Studien nötig. Insbesondere wären für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse Studien mit einem standardisierten experimentellen Aufbau nützlich. So könnte ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Resultate durch einen abweichenden Versuchsaufbau entstehen (z.B. Art des Biofilms auf den Prüfkörpern, Konzentration der getesteten Substanzen, Behandlungsdauer) anstatt durch die unterschiedliche Effektivität der Substanzen oder Reinigungsmethoden hervorgerufen zu werden (148). Außerdem wären Studien mit einer größeren Probenanzahl hilfreich, um das vorliegende Ergebnis zu überprüfen. Darüber hinaus wäre es interessant, in weiteren Studien Versuche mit unterschiedlichen Titanoberflächen durchzuführen, die den Gewindeanteilen bzw. polierten Anteilen der Implantate entsprechen.

Insgesamt entspricht das Ergebnis, dass Hinokitiol die Bakterienanzahl auf den Implantatoberflächen in etwas geringerem Umfang als Chlorhexidin reduziert, den Erwartungen, da Chlorhexidin als Goldstandard ein häufig eingesetztes Antiseptikum ist (149, 150) und Hinokitiol auch in den Agardiffusionstests vorliegender Studie sowie weiteren anderen Untersuchungen antibakterielle Wirksamkeit u.a. gegenüber *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* aufwies (42, 43, 46).

Die In-vitro-Studien von Shih et al. (46) sowie Wang et al. (42) befassen sich ebenfalls mit der antibakteriellen Wirksamkeit von Hinokitiol im Vergleich zu Chlorhexidin. Beide

Untersuchungen bestätigen, dass Chlorhexidin eine niedrigere MIC gegenüber *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Streptococcus mutans* aufweist als Hinokitiol (42, 46). Diese Tatsache steht in Einklang mit den aktuellen Ergebnissen.

6. Zusammenfassung

Die Parodontitis und die Zahnkaries stellen die häufigsten Erkrankungen der Mundhöhle und die Hauptursachen für den Verlust von Zähnen dar. Mikrobielle Biofilme und die bakterielle Dysbiose sind ätiopathogenetisch eng mit der Karies, der Parodontitis und der Periimplantitis verknüpft. Die therapeutische Reinigung von Zähnen und Implantaten von diesen Biofilmen gestaltet sich jedoch, insbesondere aufgrund deren spezieller Oberflächenmorphologie, häufig schwierig. Deshalb ist es wichtig, Antiseptika zu entwickeln, die eine unterstützende Behandlung von dysbiotischen Biofilmen ermöglichen. Hinokitiol ist eine pflanzliche Substanz, die diese Kriterien erfüllen könnte.

Ziel vorliegender Studie war es zu untersuchen, ob Hinokitiol, Zinkchlorid und deren Kombination einen antibakteriellen Effekt auf ausgewählte parodontopathogene und kariogene Bakterien haben. Mit Hilfe von Agardiffusionstests wurde die antibakterielle Wirkung der beiden Substanzen auf *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* und *Porphyromonas gingivalis* getestet. Zusätzlich wurde die antibakterielle Wirkung von Hinokitiol im Vergleich zum Goldstandard Chlorhexidin auf den Oberflächen von dentalen Implantaten, die in Speichel und Flüssigkultur von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* eingebracht worden waren, mit Hilfe des BacTiter-Glo, einem Zellviabilitäts-Assay und einer rasterelektronenmikroskopischen Analyse geprüft.

In den Agardiffusionstests erwies sich Hinokitiol im Gegensatz zu Zinkchlorid insgesamt als wirksam gegenüber den getesteten oralpathogenen Bakterien. Kombinationen aus Hinokitiol und Zinkchlorid bewirkten eine Hemmhofbildung in der Größe, die der jeweils enthaltenen Hinokitiolkonzentration entsprachen. Eine Hinokitiol-haltige Mundspüllösung erzeugte unverdünnt bei allen fünf Bakterienstämmen Hemmhöfe. Auch im Rahmen der Versuche zur Reinigung von Implantaten zeigte sich eine erhebliche antibakterielle Wirksamkeit von Hinokitiol, die im Vergleich zum Goldstandard Chlorhexidin jedoch schwächer war. Die Anzahl an Bakterien, die sich nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen auf den Implantaten befand, unterschied sich innerhalb der zwei Gruppen (Reinigung mit Schaumstoffpellet bzw. Einbringen in die jeweiligen Substanzen) signifikant voneinander.

Insgesamt bestätigt vorliegende Studie den in der Literatur beschriebenen antibakteriellen Effekt von Hinokitiol gegenüber oralpathogenen Bakterien. Dieser scheint aber sowohl bei Anwendung von Hinokitiol alleine als auch als fertige Zubereitung in einer Mundspüllösung geringer zu sein als für den Goldstandard Chlorhexidin. Eine antimikrobielle Wirksamkeit von Zink konnte nicht beobachtet werden.

7. Abstract

Background: Hinokitiol (β -thujaplicin) is an essential oil isolated from the cypress plant *Chamacyparis taiwanesis*.

In various studies, hinokitiol has been shown to have anti-viral, anti-fungal, anti-tumor, and anti-inflammatory effects in addition to anti-bacterial activity. According to some studies, the anti-bacterial effect of hinokitiol can be enhanced by combining it with zinc. In this combination, hinokitiol acts as an ionophore, causing the uptake of zinc into cells, which is also thought to have anti-bacterial effects.

Objectives: The aim of the study was to determine whether there is an anti-bacterial effect of zinc chloride, hinokitiol, a combination of the two substances or a mouth rinse against selected cariogenic or periodontal pathogenic bacteria.

Furthermore, the study investigated whether decontamination of implants can be achieved by the anti-bacterial activity of these substances.

Methods: Disc-diffusion-tests with hinokitiol, zinc chloride and the mouth rinse, which contains both substances, were performed closely in accordance with EUCAST guidelines. Antibiotics effective against the respective bacteria served as positive-control (p.c.), and liquid medium/DMSO as negative-control (n.c.). To test whether hinokitiol can be used to decontaminate implants, the latter were incubated, first in saliva (for one week), and subsequently in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-liquid-culture (for three weeks). After contamination, the implants were treated with hinokitiol, sodium chloride and chlorhexidine. The treatment was performed by cleaning the implants with a soaked pellet (60 seconds) or by placing them in the decontaminating solution for two hours. The p.c. consisted of non-decontaminated implants, the n.c. of sterile implants. Images of the implant surfaces were taken using scanning-electron-microscopy to visualize the extent of decontamination. BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay was performed to quantify the remaining bacteria.

Results: Hinokitiol and the mouth rinse, in contrast to zinc chloride, caused the formation of inhibition zones in disc-diffusion-tests. The BacTiter-Glo assay showed that most bacteria remained on the implant surface following to the treatment with sodium chloride. Fewer bacteria persisted, when Hinokitiol was used. Chlorhexidine was the most effective substance for decontamination. The number of bacteria still present on the implants after treatment with the various substances differed significantly within the two groups (cleaning with foam pellet or immersion of the implants). The results were visualized qualitatively by scanning-electron-microscopy.

Conclusion: Hinokitiol shows antibacterial activity against some cariogenic and periodontopathogenic bacteria, whereas zinc chloride did not increase this effect in this study. Hinokitiol might be used in dentistry in the future. Further studies – especially in-vivo studies – are required to confirm that Hinokitiol is a safe and effective antiseptic.

8. Literaturverzeichnis

1. Steinmetz I, Eickholz P. Infektionen der Zähne und des Zahnhalteapparates. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie [e-book]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2020 [cited 2025 April 06]. p. 1169-77.
DOI: 10.1007/978-3-662-61385-6_126
2. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):127-35.
DOI: 10.33073/pjm-2014-018
3. Jordan AR, Micheelis W. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) [pdf]. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV; 2016 [cited 2025 April 06]. Available from: https://www.idz.institute/fileadmin/Content/Publikationen-PDF/Bd_35-Fuenfte_Deutsche_Mundgesundheitsstudie_DMS_V.pdf
4. Hellwig E, Schäfer E, Klimek J, Attin T. Einführung in die Zahnerhaltung. Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag; 2018.
5. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig DF, Garcia R, Giannobile W, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kerschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):173-82. DOI: 10.1002/jper.17-0721
6. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):159-72. DOI: 10.1002/jper.18-0006
7. Institut der Deutschen Zahnärzte im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) – Kurzfassung [pdf]. 2016 [cited 2025 April 06]. Available from: <https://www.kzbv.de/dms-v-kurzfassung-2016-web.download.4f8d7ffcc1f2f0e2d28c05914652b45c.pdf>
8. Hajishengallis G, Chavakis T, Lambris JD. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. *Periodontol 2000.* 2020;84(1):14-34. DOI: 10.1111/prd.12331
9. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17038. DOI: 10.1038/nrdp.2017.38

10. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* 2014;35(1):3-11. DOI: 10.1016/j.it.2013.09.001
11. Loe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986;13(5):431-45. DOI: 10.1111/j.1600-051x.1986.tb01487.x
12. Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am.* 2005;49(3):491-516. DOI: 10.1016/j.cden.2005.03.001
13. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. *Int Dent J.* 2021;71(6):462-76. DOI: 10.1111/idj.12630
14. Pschyrembel W, Zink C. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Mit klinischen Syndromen und Nomina anatomica* [e-book]. 256th ed. Berlin, Boston: De Gruyter; 2022 [cited 2025 April 06]. Available from: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/9783112328545/html>
15. Könönen E, Gursoy M, Gursoy UK. Periodontitis: a multifaceted disease of tooth-supporting tissues. *J Clin Med.* 2019;8(8). DOI: 10.3390/jcm8081135
16. Van Dyke TE, Sheilesh D. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol.* 2005;7(1):3-7. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1351013/pdf/nihms4855.pdf>
17. Bouchard P, Carra MC, Boillot A, Mora F, Rangé H. Risk factors in periodontology: a conceptual framework. *J Clin Periodontol.* 2017;44(2):125-31. DOI: 10.1111/jcpe.12650
18. Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):2. DOI: 10.1038/s41368-019-0068-8
19. Pani P, Tsilioni I, McGlennen R, Brown CA, Hawley CE, Theoharides TC, Papathanasiou E. IL-1B(3954) polymorphism and red complex bacteria increase IL-1 β (GCF) levels in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2021;56(3):501-11. DOI: 10.1111/jre.12850
20. Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (DG PARO), Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). S3-Leitlinie (Langversion): Die Behandlung von Parodontitis Stadium I bis III. Die deutsche Implementierung der S3-Leitlinie „Treatment of Stage I–III Periodontitis“ der European Federation of Periodontology (EFP) [pdf]. 2020 [cited 2025 April 06]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/083-043l_S3_Behandlung-von-Parodontitis-Stadium-I-III_2021-02_2.pdf

21. Sanz M, Herrera D, Kerschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, Sculean A, Tonetti MS. Treatment of stage I-III periodontitis—the EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020;47(Suppl 22):4-60. DOI: 10.1111/jcpe.13290
22. Kröger A, Hülsmann C, Fickl S, Spinell T, Hüttig F, Kaufmann F, Heimbach A, Hoffmann P, Enkling N, Renvert S, Schwarz F, Demmer RT, Papapanou PN, Jepsen S, Kerschull M. The severity of human peri-implantitis lesions correlates with the level of submucosal microbial dysbiosis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(12):1498-509. DOI: 10.1111/jcpe.13023
23. Belibasakis GN, Manoil D. Microbial community-driven etiopathogenesis of peri-implantitis. *J Dent Res*. 2021;100(1):21-8. DOI: 10.1177/0022034520949851
24. Derks J, Tomasi C. Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol*. 2015;42(Suppl 16):158-71. DOI: 10.1111/jcpe.12334
25. Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LO, Ferreira SD, Silva GL, Costa JE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 2012;39(2):173-81. DOI: 10.1111/j.1600-051X.2011.01819.x
26. Herrera D, Berglundh T, Schwarz F, Chapple I, Jepsen S, Sculean A, Kerschull M, Papapanou PN, Tonetti MS, Sanz M. Prevention and treatment of peri-implant diseases—the EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2023;50(Suppl 26):4-76. DOI: 10.1111/jcpe.13823
27. Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, Chen S, Cochran D, Derks J, Figuero E, Hämmerle CHF, Heitz-Mayfield LJA, Huynh-Ba G, Iacono V, Koo KT, Lambert F, McCauley L, Quirynen M, Renvert S, Salvi GE, Schwarz F, Tarnow D, Tomasi C, Wang HL, Zitzmann N. Peri-implant diseases and conditions: consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*. 2018;45(Suppl 20):286-91. DOI: 10.1111/jcpe.12957
28. Carvalho É BS, Romandini M, Sadilina S, Sant'Ana ACP, Sanz M. Microbiota associated with peri-implantitis—a systematic review with meta-analyses. *Clin Oral Implants Res*. 2023;34(11):1176-87. DOI: 10.1111/clr.14153
29. Sahrman P, Gilli F, Wiedemeier DB, Attin T, Schmidlin PR, Karygianni L. The microbiome of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Microorganisms*. 2020;8(5):661. DOI: 10.3390/microorganisms8050661
30. Schwarz F, Beck J, Dick KA, Lorenz J, Müller T, Neumann W, Obreja K, Ramanauskaite A, Reinicke K, Schliephake C, Schiegnitz E, Ullner M. Die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten. S3-Leitlinie (Langfassung). In: Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich (DGI), Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK), editors. Leitlinien Zahnmedizin [pdf].

AWMF online; 2022 [cited 2025 April 06]. Available from:
<https://www.dginet.de/wp-content/uploads/sites/4/2023/08/Leitlinie-Periimplantitis-2023.pdf>

31. Schwarz F, Becker J, Bach G., Bartsch K, Beck J, Blume M., Iglhaut G, Kebschull M, Ritter L, Schlee M, Stiesch M, Stiller M, Wolf T. Die Behandlung periimplantärer Infektionen an Zahnimplantaten. S3-Leitlinie (Langversion). In: Deutsche Gesellschaft für Implantologie im Zahn-, Mund- und Kieferbereich (DGI), Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK), editors. Leitlinien Zahnmedizin [pdf]. AWMF online; 2016 [cited 2025 April 25]. Available from:
<https://www.dgzmk.de/documents/10165/1373255/implperiimplang.pdf/b7ec8fa6-cf92-4621-aae1-2640c8150f0a>
32. Rupp F, Liang L, Geis-Gerstorfer J, Scheideler L, Hüttig F. Surface characteristics of dental implants: a review. *Dent Mater.* 2018;34(1):40-57.
DOI: 10.1016/j.dental.2017.09.007
33. Hsu LC, Fang J, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(8):2703-12. DOI: 10.1128/aem.03436-12
34. Whitehead KA, Rogers D, Colligon J, Wright C, Verran J. Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006;51(1):44-53.
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.05.003
35. Whitehead KA, Colligon J, Verran J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005;41(2-3):129-38. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.11.010
36. Singh AV, Vyas V, Patil R, Sharma V, Scopelliti PE, Bongiorno G, Podestà A, Lenardi C, Gade WN, Milani P. Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation. *PLoS One.* 2011;6(9):e25029. DOI: 10.1371/journal.pone.0025029
37. Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: a dental microbial infection. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2(1):71-5. DOI: 10.4103/0976-9668.82317
38. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(5):990-1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x
39. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn-Warren L, Stafford GP, Cieplik F. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontol 2000.* 2021;86(1):32-56. DOI: 10.1111/prd.12361
40. Pisarska A, Wolinowska R, Rudnicka J. Characteristics of clinical isolates of *Streptococcus mutans*. *Appl Sci.* 2022;12(9):4579. DOI: 10.3390/app12094579

41. Lasserre JF, Brex MC, Toma S. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials (Basel)*. 2018;11(10):1802.
DOI: 10.3390/ma11101802
42. Wang TH, Hsia SM, Wu CH, Ko SY, Chen MY, Shih YH, Shieh TM, Chuang LC, Wu CY. Evaluation of the antibacterial potential of liquid and vapor phase phenolic essential oil compounds against oral microorganisms. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163147.
DOI: 10.1371/journal.pone.0163147
43. Domon H, Hiyoshi T, Maekawa T, Yonezawa D, Tamura H, Kawabata S, Yanagihara K, Kimura O, Kunitomo E, Terao Y. Antibacterial activity of hinokitiol against both antibiotic-resistant and -susceptible pathogenic bacteria that predominate in the oral cavity and upper airways. *Microbiol. Immunol.* 2019;63(6):213-22.
DOI: 10.1111/1348-0421.12688
44. Inoue Y, Suzuki R, Murata I, Nomura H, Isshiki Y, Kanamoto I. Evaluation of antibacterial activity expression of the hinokitiol/cyclodextrin complex against bacteria. *ACS Omega*. 2020;5(42):27180-7. DOI: 10.1021/acsomega.0c03222
45. Zhu YJ, Qiu L, Zhou JJ, Guo HY, Hu YH, Li ZC, Wang Q, Chen QX, Liu B. Inhibitory effects of hinokitiol on tyrosinase activity and melanin biosynthesis and its antimicrobial activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2010;25(6):798-803.
DOI: 10.3109/14756360903476398
46. Shih YH, Chang KW, Hsia SM, Yu CC, Fuh LJ, Chi TY, Shieh TM. In vitro antimicrobial and anticancer potential of hinokitiol against oral pathogens and oral cancer cell lines. *Microbiol Res*. 2013;168(5):254-62. DOI: 10.1016/j.micres.2012.12.007
47. Iha K, Suzuki N, Yoneda M, Takeshita T, Hirofuji T. Effect of mouth cleaning with hinokitiol-containing gel on oral malodor: a randomized, open-label pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116(4):433-9.
DOI: 10.1016/j.oooo.2013.05.021
48. Morita Y, Sakagami Y, Okabe T, Ohe T, Inamori Y, Ishida N. The mechanism of the bactericidal activity of hinokitiol. *Biocontrol Sci*. 2007;12(3):101-10.
DOI: 10.4265/bio.12.101
49. Trust TJ, Coombs RW. Antibacterial activity of beta-thujaplicin. *Can J Microbiol*. 1973;19(11):1341-6. DOI: 10.1139/m73-216
50. Ishii J, Omura H, Mitsui T, Eguchi N, Ueno T, Goto H, Ito H. Effects of a combination of hinokitiol (β -thujaplicin) and an organic acid mixture on ruminal fermentation in heifers fed a high-grain diet. *Anim Sci J*. 2012;83(1):36-42.
DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.00915.x
51. El Hachlafi N, Lakhdar F, Khouchlaa A, Bakrim S, El Omari N, Balahbib A, Shariati MA, Zengin G, Fikri-Benbrahim K, Orlando G, Ferrante C, Meninghi L, Bouyahya A. Health

- benefits and pharmacological properties of hinokitiol. *Processes*. 2021;9(9):1680. DOI: 10.3390/pr9091680
52. Coombs RW, Trust TJ. The effect of light on the antibacterial activity of beta-thujaplicin. *Can J Microbiol*. 1973;19(9):1177-80. DOI: 10.1139/m73-190
 53. Hiyoshi T, Domon H, Maekawa T, Yonezawa D, Kunitomo E, Tabeta K, Terao Y. Protective effect of hinokitiol against periodontal bone loss in ligature-induced experimental periodontitis in mice. *Arch Oral Biol*. 2020;112:104679. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2020.104679
 54. Saper RB, Rash R. Zinc: an essential micronutrient. *Am Fam Physician*. 2009;79(9):768-72. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820120/pdf/nihms125075.pdf>
 55. Xia P, Lian S, Wu Y, Yan L, Quan G, Zhu G. Zinc is an important inter-kingdom signal between the host and microbe. *Vet Res*. 2021;52(1):39. DOI: 10.1186/s13567-021-00913-1
 56. Wąty J, Potocki S, Rowińska-Żyrek M. Zinc homeostasis at the bacteria/host interface-from coordination chemistry to nutritional immunity. *Chemistry*. 2016;22(45):15992-6010. DOI: 10.1002/chem.201602376
 57. Lynch RJ. Zinc in the mouth, its interactions with dental enamel and possible effects on caries; a review of the literature. *Int Dent J*. 2011;61(Suppl 3):46-54. DOI: 10.1111/j.1875-595X.2011.00049.x
 58. Capdevila DA, Wang J, Giedroc DP. Bacterial strategies to maintain zinc metallostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem*. 2016;291(40):20858-68. DOI: 10.1074/jbc.R116.742023
 59. Uwitonze AM, Ojeh N, Murererehe J, Atfi A, Razzaque MS. Zinc adequacy is essential for the maintenance of optimal oral health. *Nutrients*. 2020;12(4):949. DOI: 10.3390/nu12040949
 60. Ye Q, Chen W, Huang H, Tang Y, Wang W, Meng F, Wang H, Zheng Y. Iron and zinc ions, potent weapons against multidrug-resistant bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020;104(12):5213-27. DOI: 10.1007/s00253-020-10600-4
 61. Kang JH, Jang YJ, Kim DJ, Park JW. Antimicrobial effectiveness of cetylpyridinium chloride and zinc chloride-containing mouthrinses on bacteria of halitosis and peri-implant disease. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(6):1341-7. DOI: 10.11607/jomi.3824
 62. He G, Pearce EI, Sissons CH. Inhibitory effect of ZnCl₂ on glycolysis in human oral microbes. *Arch Oral Biol*. 2002;47(2):117-29. DOI: 10.1016/s0003-9969(01)00093-0

63. Suzuki N, Nakano Y, Watanabe T, Yoneda M, Hirofujii T, Hanioka T. Two mechanisms of oral malodor inhibition by zinc ions. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170161. DOI: 10.1590/1678-7757-2017-0161
64. Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodont Res.* 2001;36(2):108-13. DOI: 10.1034/j.1600-0765.2001.360207.x
65. Arima Y, Nakai Y, Hayakawa R, Nishino T. Antibacterial effect of beta-thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(1):113-22. DOI: 10.1093/jac/dkg037
66. Hoang BX, Han B. A possible application of hinokitiol as a natural zinc ionophore and anti-infective agent for the prevention and treatment of COVID-19 and viral infections. *Med Hypotheses.* 2020;145:110333. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.110333
67. Krenn BM, Gaudernak E, Holzer B, Lanke K, Van Kuppeveld FJ, Seipelt J. Antiviral activity of the zinc ionophores pyrithione and hinokitiol against picornavirus infections. *J Virol.* 2009;83(1):58-64. DOI: 10.1128/jvi.01543-08
68. Rajendiran M, Trivedi HM, Chen D, Gajendrareddy P, Chen L. Recent development of active ingredients in mouthwashes and toothpastes for periodontal diseases. *Molecules.* 2021;26(7). DOI: 10.3390/molecules26072001
69. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing. EUCAST disk diffusion method. Version 9.0 [pdf]. 2021 [cited 2025 April 06]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2021_manuals/Manual_v_9.0_EUCAST_Disk_Test_2021.pdf
70. Little WA, Thomson LA, Bowen WH. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus mutans*: comparison of serotype profiles. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979;15(3):440-3. DOI: 10.1128/aac.15.3.440
71. Wolff A, Rodloff AC, Vielkind P, Borgmann T, Stingu CS. Antimicrobial susceptibility of clinical oral isolates of *Actinomyces* spp. *Microorganisms.* 2022;10(1):125. DOI: 10.3390/microorganisms10010125
72. Jensen AB, Haubek D, Claesson R, Johansson A, Nørskov-Lauritsen N. Comprehensive antimicrobial susceptibility testing of a large collection of clinical strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* does not identify resistance to amoxicillin. *J Clin Periodontol.* 2019;46(8):846-54. DOI: 10.1111/jcpe.13148

73. Denes E, Barraud O. *Fusobacterium nucleatum* infections: clinical spectrum and bacteriological features of 78 cases. *Infection*. 2016;44(4):475-81. DOI: 10.1007/s15010-015-0871-x
74. Gamboa F, Acosta A, García DA, Velosa J, Araya N, Ledergerber R. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and its antibacterial susceptibility to metronidazole and tetracycline in patients with chronic periodontitis. *Acta Odontol Latinoam*. 2014;27(3):137-44. DOI: 10.1590/s1852-48342014000300007
75. DSMZ. 92. Trypticase Soy Yeast Extract Medium [pdf]. 2012 [cited 2025 April 06]. Available from: https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium92.pdf
76. Zimmer Biomet. T3 Implantat. Ein modernes Hybrid-Implantat [pdf]. 2019 [cited 2025 April 06]. Available from: https://stage-www.zimvie.eu/content/dam/zimvie-corporate/en/products/brochures/zb0010de_rev_b_t3_surface_comparison_final_secured.pdf
77. Promega Corporation. BacTiter Glo Microbial Cell Viability Assay. Technical bulletin [pdf]. 2019 [cited 2025 April 06]. Available from: https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/bactiter-glo-microbial-cell-viability-assay-protocol.pdf?rev=0ce55f402f4f418eb2862911968f6022&sc_lang=en
78. Steinbüchel A, Oppermann-Sanio FB, Ewering C, Pötter M. *Mikrobiologisches Praktikum. Versuche und Theorie* [e-book]. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2013 [cited 2025 April 06]. DOI: 10.1007/978-3-642-25151-1
79. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
80. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*. 2010;2(3):290-8. DOI: 10.3390/nu2030290
81. Chen L, Ma L, Park NH, Shi W. Cariogenic actinomyces identified with a beta-glucosidase-dependent green color reaction to *Gardenia jasminoides* extract. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):3009-12. DOI: 10.1128/jcm.39.8.3009-3012.2001
82. Deng L, Li W, He Y, Wu J, Ren B, Zou L. Cross-kingdom interaction of *Candida albicans* and *Actinomyces viscosus* elevated cariogenic virulence. *Arch Oral Biol*. 2019;100:106-12. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019.02.008
83. Raja M, Ummer F, Dhivakar CP. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*—a tooth killer? *J Clin Diagn Res*. 2014;8(8):Ze13-6. DOI: 10.7860/jcdr/2014/9845.4766
84. Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, Sogawa CA, Asaumi J, Koikeguchi S, Fukui, K. Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiol Immunol*. 2003;47(11):877-81. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2003.tb03454.x

85. Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(3):156-66. DOI: 10.1038/s41579-018-0129-6
86. Valm AM. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J Mol Biol.* 2019;431(16):2957-69. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.016
87. Mysak J, Podzimek S, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Bartova J, Janatova T, Prochazkova J, Duskova J. *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res.* 2014;2014:476068. DOI: 10.1155/2014/476068
88. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;333(1):1-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02579.x
89. Ishak A, Mazonakis N, Spernovasilis N, Akinosoglou K, Tsioutis C. Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. *J Antimicrob Chemother.* 2025;80(1):1-17. DOI: 10.1093/jac/dkae380
90. Bavelaar H, Justesen US, Morris TE, Anderson B, Copsey-Mawer S, Stubhaug TT, Kahlmeter G, Matuschek E. Development of a EUCAST disk diffusion method for the susceptibility testing of rapidly growing anaerobic bacteria using Fastidious Anaerobe Agar (FAA): a development study using *Bacteroides* species. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(11):1695.e1-.e6. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.03.028
91. Almoudi MM, Hussein AS, Hassan MIA, Zain NM. A systematic review on antibacterial activity of zinc against *Streptococcus mutans*. *Saudi Dent J.* 2018;30(4):283-91. DOI: 10.1016/j.sdentj.2018.06.003
92. Griauzdyte V, Jagelaviciene E. Antimicrobial activity of zinc against periodontal pathogens: a systematic review of in vitro studies. *Medicina (Kaunas).* 2023;59(12):1-16. DOI: 10.3390/medicina59122088
93. Dias AM, da Silva FG, Monteiro APF, Pinzón-García AD, Sinisterra RD, Cortés ME. Polycaprolactone nanofibers loaded oxytetracycline hydrochloride and zinc oxide for treatment of periodontal disease. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019;103:109798. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109798
94. Wang J, Du L, Fu Y, Jiang P, Wang X. ZnO nanoparticles inhibit the activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinomyces naeslundii* and promote the mineralization of the cementum. *BMC Oral Health.* 2019;19(1):84. DOI: 10.1186/s12903-019-0780-y

95. Mou J, Liu Z, Liu J, Lu J, Zhu W, Pei D. Hydrogel containing minocycline and zinc oxide-loaded serum albumin nanoparticle for periodontitis application: preparation, characterization and evaluation. *Drug Deliv.* 2019;26(1):179-87. DOI: 10.1080/10717544.2019.1571121
96. Mlinarić A, Horvat M, Šupak Smolčić V. Dealing with the positive publication bias: why you should really publish your negative results. *Biochem Med (Zagreb).* 2017;27(3):030201. DOI: 10.11613/bm.2017.030201
97. Hoang BX, Hoang HQ, Han B. Zinc Iodide in combination with Dimethyl sulfoxide for treatment of SARS-CoV-2 and other viral infections. *Med Hypotheses.* 2020;143:109866. DOI: 10.1016/j.mehy.2020.109866
98. Karim M, Boikess RS, Schwartz RA, Cohen PJ. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. *Arch Dermatol Res.* 2023;315(6):1465-72. DOI: 10.1007/s00403-022-02494-1
99. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules.* 2019;24(11):2130. DOI: 10.3390/molecules24112130
100. Souza JGS, Cordeiro JM, Lima CV, Barão VAR. Citric acid reduces oral biofilm and influences the electrochemical behavior of titanium: an in situ and in vitro study. *J Periodontol.* 2019;90(2):149-58. DOI: 10.1002/jper.18-0178
101. Giardino L, Generali L, Savadori P, Barros MC, de Melo Simas LL, Pytko-Polończyk J, Wilkoński W, Ballal V, de Andrade FB. Can the concentration of citric acid affect its cytotoxicity and antimicrobial activity? *Dent J (Basel).* 2022;10(8):148. DOI: 10.3390/dj10080148
102. Eagle H. A Paradoxical zone phenomenon in the bactericidal action of penicillin in vitro. *Science.* 1948;107(2767):44-5. DOI: 10.1126/science.107.2767.44
103. Tanouchi Y, Pai A, Buchler NE, You L. Programming stress-induced altruistic death in engineered bacteria. *Mol Syst Biol.* 2012;8:626. DOI: 10.1038/msb.2012.57
104. Pienaar E, Whitney SE, Viljoen HJ, van Rensburg NF. A model of the complex response of *Staphylococcus aureus* to methicillin. *J Theor Biol.* 2009;257(3):438-45. DOI: 10.1016/j.jtbi.2008.12.003
105. Bulman CA, Chappell L, Gunderson E, Vogel I, Beerntsen B, Slatko BE, Sullivan W, Sakanari JA. The Eagle effect in the *Wolbachia*-worm symbiosis. *Parasit Vectors.* 2021;14(1):118. DOI: 10.1186/s13071-020-04545-w
106. Prasetyoputri A, Jarrad AM, Cooper MA, Blaskovich MAT. The Eagle effect and antibiotic-induced persistence: two sides of the same coin? *Trends Microbiol.* 2019;27(4):339-54. DOI: 10.1016/j.tim.2018.10.007

107. Grandière-Pérez L, Jacqueline C, Lemabecque V, Patey O, Potel G, Caillon J. Eagle effect in *Corynebacterium diphtheriae*. *J Infect Dis*. 2005;191(12):2118-20. DOI: 10.1086/430350
108. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*. 2021;10(2):165. DOI: 10.3390/pathogens10020165
109. Flores-Kim J, Dobihal GS, Fenton A, Rudner DZ, Bernhardt TG. A switch in surface polymer biogenesis triggers growth-phase-dependent and antibiotic-induced bacteriolysis. *Elife*. 2019;8:e44912. DOI: 10.7554/eLife.44912
110. Nishino T, Nakazawa S. Bacteriological study on effects of beta-lactam group antibiotics in high concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1976;9(6):1033-42. DOI: 10.1128/aac.9.6.1033
111. Vanstraelen K, Lagrou K, Maertens J, Wauters J, Willems L, Spriet I. The Eagle-like effect of echinocandins: what's in a name? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(11):1179-91. DOI: 10.1586/14787210.2013.841543
112. Osawa K, Matsumoto T, Maruyama T, Takiguchi T, Okuda K, Takazoe I. Studies of the antibacterial activity of plant extracts and their constituents against periodontopathic bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1990;31(1):17-21.
113. Nishitani K, Sutipornpalangkul W, de Mesy Bentley KL, Varrone JJ, Bello-Irizarry SN, Ito H, Matsuda S, Kates SL, Daiss JL, Schwarz EM. Quantifying the natural history of biofilm formation in vivo during the establishment of chronic implant-associated *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in mice to identify critical pathogen and host factors. *J Orthop Res*. 2015;33(9):1311-9. DOI: 10.1002/jor.22907
114. Närhi TO, Leminen H, Haukioja A, Söderling E. Adhesion of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* on bioactive TiO₂ surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(1):45-9. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2011.02399.x
115. Kammoun R, Zmantar T, Ghoul S. Scanning electron microscopy approach to observe bacterial adhesion to dental surfaces. *MethodsX*. 2020;7:101107. DOI: 10.1016/j.mex.2020.101107
116. Matos AO, Ricomini-Filho AP, Beline T, Ogawa ES, Costa-Oliveira BE, de Almeida AB, Nociti FH, Rangel EC, da Cruz NC, Sukotjo C, Mathew MT, Barão VAR. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;152:354-66. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.035
117. Widodo A, Spratt D, Sousa V, Petrie A, Donos N. An in vitro study on disinfection of titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(10):1227-32. DOI: 10.1111/clr.12733

118. Passarelli PC, De Leonardis M, Piccirillo GB, Desantis V, Papa R, Rella E, Bonaviri GNM, Papi P, Pompa G, Pasquantonio G, Manicone PF, D'Addona A. The effectiveness of chlorhexidine and air polishing system in the treatment of *Candida albicans* infected dental implants: an experimental in vitro study. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(4):179. DOI: 10.3390/antibiotics9040179
119. Venkei A, Eördegh G, Turzó K, Urbán E, Ungvári K. A simplified in vitro model for investigation of the antimicrobial efficacy of various antiseptic agents to prevent peri-implantitis. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020;67(2):127-32. DOI: 10.1556/030.2020.01080
120. Siddiqui DA, Fidai AB, Natarajan SG, Rodrigues DC. Succession of oral bacterial colonizers on dental implant materials: an in vitro biofilm model. *Dent Mater*. 2022;38(2):384-96. DOI: 10.1016/j.dental.2021.12.021
121. Doll K, Jongstaphongpun KL, Stumpp NS, Winkel A, Stiesch M. Quantifying implant-associated biofilms: comparison of microscopic, microbiologic and biochemical methods. *J Microbiol Methods*. 2016;130:61-8. DOI: 10.1016/j.mimet.2016.07.016
122. Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(9):4135-45. DOI: 10.1007/s00253-016-7396-9
123. Kromidas S. Methodvalidierung in der Analytik [pdf]. 2023 [cited 2025 April 06]. Available from: <https://www.kromidas.de/Uploads/Dokumente/ValidierunginderAnalytik.pdf>
124. Sterzenbach T, Helbig R, Hannig C, Hannig M. Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clin Oral Investig*. 2020;24(12):4237-60. DOI: 10.1007/s00784-020-03646-1
125. Dhaliwal JS, Abd Rahman NA, Ming LC, Dhaliwal SKS, Knights J, Albuquerque Junior RF. Microbial biofilm decontamination on dental implant surfaces: a mini review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:736186. DOI: 10.3389/fcimb.2021.736186
126. Kim SH, Park SH, Chang BS, Lee SY, Lee JK, Um HS. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using methylene blue and red color diode laser on biofilm attached to sandblasted and acid-etched surface of titanium. *Lasers in Dental Science*. 2017;1(2):83-90. DOI: 10.1007/s41547-017-0009-9
127. Ramesh D, Sridhar S, Siddiqui DA, Valderrama P, Rodrigues DC. Detoxification of titanium implant surfaces: evaluation of surface morphology and bone-forming cell compatibility. *Journal of Bio- and Tribo-Corrosion*. 2017;3(4):50. DOI: 10.1007/s40735-017-0111-2

128. Lee BS, Shih KS, Lai CH, Takeuchi Y, Chen YW. Surface property alterations and osteoblast attachment to contaminated titanium surfaces after different surface treatments: an in vitro study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2018;20(4):583-91. DOI: 10.1111/cid.12624
129. Eick S, Markauskaite G, Nietzsche S, Laugisch O, Salvi GE, Sculean A. Effect of photoactivated disinfection with a light-emitting diode on bacterial species and biofilms associated with periodontitis and peri-implantitis. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2013;10(2):156-67. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2012.12.001
130. Huang TC, Chen CJ, Ding SJ, Chen CC. Antimicrobial efficacy of methylene blue-mediated photodynamic therapy on titanium alloy surfaces in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:7-16. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.008
131. Li H, Liu H, Zhang L, Hieawy A, Shen Y. Evaluation of extracellular polymeric substances matrix volume, surface roughness and bacterial adhesion property of oral biofilm. *J Dent Sci.* 2023;18(4):1723-30. DOI: 10.1016/j.jds.2022.12.022
132. Tardelli JDC, Bagnato VS, Reis ACD. Bacterial adhesion strength on titanium surfaces quantified by atomic force microscopy: a systematic review. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(6):994. DOI: 10.3390/antibiotics12060994
133. Bergamini S, Bellei E, Generali L, Tomasi A, Bertoldi C. A proteomic analysis of discolored tooth surfaces after the use of 0.12% Chlorhexidine (CHX) mouthwash and CHX provided with an Anti-Discoloration System (ADS). *Materials (Basel).* 2021;14(15):4338. DOI: 10.3390/ma14154338
134. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent.* 2020;103:103497. DOI: 10.1016/j.jdent.2020.103497
135. Jiang Q, Deng Y, Li S, Yang D, Tao L. Sub-lethal concentrations of chlorhexidine inhibit *Candida albicans* growth by disrupting ROS and metal ion homeostasis. *J Oral Microbiol.* 2023;15(1):2278937. DOI: 10.1080/20002297.2023.2278937
136. Lin F, Yu B, Wang Q, Yuan M, Ling B. Combination inhibition activity of chlorhexidine and antibiotics on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in vitro. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):266. DOI: 10.1186/s12879-021-05963-6
137. Brookes Z, Teoh L, Cieplik F, Kumar P. Mouthwash effects on the oral microbiome: are they good, bad, or balanced? *Int Dent J.* 2023;73(Suppl 2):s74-s81. DOI: 10.1016/j.identj.2023.08.010
138. Brookes ZLS, Belfield LA, Ashworth A, Casas-Agustench P, Raja M, Pollard AJ, Bescos R. Effects of chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *J Dent.* 2021;113:103768. DOI: 10.1016/j.jdent.2021.103768

139. Dostie S, Alkadi LT, Owen G, Bi J, Shen Y, Haapasalo M, Larjava HS. Chemotherapeutic decontamination of dental implants colonized by mature multispecies oral biofilm. *J Clin Periodontol.* 2017;44(4):403-9. DOI: 10.1111/jcpe.12699
140. Hellwege KD. Die Praxis der zahnmedizinischen Prophylaxe. Ein Leitfadens für die Individualprophylaxe für Zahnärzte und Mitarbeiter. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2018.
141. Standar K. In vitro Modelle oraler Biofilme [dissertation]. Rostock: Universität Rostock; 2010 [cited 2025 April 06]. Available from: https://rosdok.uni-rostock.de/resolve/id/rosdok_disshab_0000000581. DOI: 10.18453/rosdok_id00000786
142. Wassmann T, Kreis S, Behr M, Bürgers R. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *Int J Implant Dent.* 2017;3(1):32. DOI: 10.1186/s40729-017-0093-3
143. Zablotsky MH, Diedrich DL, Meffert RM. Detoxification of endotoxin-contaminated titanium and hydroxyapatite-coated surfaces utilizing various chemotherapeutic and mechanical modalities. *Implant Dent.* 1992;1(2):154-8. DOI: 10.1097/00008505-199205000-00009
144. Gosau M, Hahnel S, Schwarz F, Gerlach T, Reichert TE, Bürgers R. Effect of six different peri-implantitis disinfection methods on in vivo human oral biofilm. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(8):866-72. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2009.01908.x
145. Kotsakis GA, Lan C, Barbosa J, Lill K, Chen R, Rudney J, et al. Antimicrobial agents used in the treatment of peri-implantitis alter the physicochemistry and cytocompatibility of titanium surfaces. *J Periodontol.* 2016;87(7):809-19. DOI: 10.1902/jop.2016.150684
146. Bürgers R, Witte C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):940-7. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2012.01.015
147. Patil C, Agrawal A, Abullais SS, Arora S, Khateeb SU, Fadul AEM. Effectiveness of different chemotherapeutic agents for decontamination of infected dental implant surface: A systematic review. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(5). DOI: 10.3390/antibiotics11050593
148. Hart I, Wells C, Tsigarida A, Bezerra B. Effectiveness of mechanical and chemical decontamination methods for the treatment of dental implant surfaces affected by peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Dent Res.* 2024;10(1):e839. DOI: 10.1002/cre2.839

149. Mathurasai W, Thanyasrisung P, Soompon S, Ayuthaya BIN. Hydrogen peroxide masks the bitterness of chlorhexidine mouthwash without affecting its antibacterial activity. *J Indian Soc Periodontol.* 2019;23(2):119-23. DOI: 10.4103/jisp.jisp_414_18
150. Liu JX, Werner J, Kirsch T, Zuckerman JD, Virk MS. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. *J Bone Jt Infect.* 2018;3(4):165-72. DOI: 10.7150/jbji.26355

9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout A.
Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Zinkchlorid 100 µM (20), Zinkchlorid 20 µM (21), Hinokitiol 100 µM (13) und Hinokitiol 20 µM (14). 28
- Abbildung 2: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout B.
Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), Hinokitiol 2500 µM (11) und Hinokitiol 500 µM (12). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Zinkchlorid 2500 µM (18) und Zinkchlorid 500 µM (19). 28
- Abbildung 3: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout C.
Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1) und Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 500 µM (22). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Hinokitiol 100 µM + Zinkchlorid 500 µM (23) und Hinokitiol 20 µM + Zinkchlorid 500 µM (24) 28
- Abbildung 4: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout D.
Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 20 µM (25) und Hinokitiol 500 µM + Zinkchlorid 2500 µM (26). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5) 28
- Abbildung 5: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*, Plattenlayout E.
Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), unverdünnter Mundspüllösung (15) und 10-prozentiger Mundspüllösung (16). Keine Hemmhofbildung bei 1-prozentiger Mundspüllösung (17)..... 29
- Abbildung 6: Ergebnisse der Agardiffusionstests für *Streptococcus mutans*; Penicillin G = Positivkontrolle, DMSO/FM = Negativkontrolle bestehend aus DMSO und flüssigem Nährmedium, Hk = Hinokitiol, ZCI = Zinkchlorid; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,0003$) 29
- Abbildung 7: Agardiffusionstest mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit Amoxicillin (2), Hinokitiol 2500 µM (11) und Hinokitiol 500 µM (12). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5), Hinokitiol 100 µM (13) und Hinokitiol 20 µM (14). 30
- Abbildung 8: Agardiffusionstest mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit Amoxicillin (2), unverdünnter Mundspüllösung (15) und 10-prozentiger Mundspüllösung (16). Keine Hemmhofbildung bei DMSO/FM (5) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17)..... 30

Abbildung 9: Ergebnisse der Agardiffusionstests für <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ; Amoxicillin = Positivkontrolle, DMSO/FM = Negativkontrolle bestehend aus DMSO und flüssigem Nährmedium, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$).....	31
Abbildung 10: Agardiffusionstest mit <i>Actinomyces viscosus</i> , Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1), Hinokitiol 20 mM (8) und Hinokitiol 40 mM (7). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), Hinokitiol 10 mM (9) und Hinokitiol 5 mM (10).	32
Abbildung 11: Agardiffusionstest mit <i>Actinomyces viscosus</i> , Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit Penicillin G (1) und unverdünnter Mundspüllösung (15). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), 10-prozentiger Mundspüllösung (16) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).....	32
Abbildung 12: Ergebnisse der Agardiffusionstests für <i>Actinomyces viscosus</i> ; Penicillin G = Positivkontrolle, DMSO = Negativkontrolle, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$)	32
Abbildung 13: Agardiffusionstest mit <i>Fusobacterium nucleatum</i> , Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit 5 µg Metronidazol (3), Hinokitiol 40 mM (7) und Hinokitiol 20 mM (8). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), Hinokitiol 10 mM (9) und Hinokitiol 5 mM (10).	33
Abbildung 14: Agardiffusionstest mit <i>Fusobacterium nucleatum</i> , Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit 5 µg Metronidazol (3) und unverdünnter Mundspüllösung (15). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), 10-prozentiger Mundspüllösung (16) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).....	33
Abbildung 15: Ergebnisse der Agardiffusionstests für <i>Fusobacterium nucleatum</i> ; Metronidazol = Positivkontrolle, DMSO = Negativkontrolle, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(\text{korr})=0,001$).....	34
Abbildung 16: Agardiffusionstest mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> , Plattenlayout A. Hemmhofbildung um Plättchen mit 0,25 µg Metronidazol (4), Hinokitiol 40 mM (7), Hinokitiol 10 mM (9) und Hinokitiol 5 mM (10). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6).	35
Abbildung 17: Agardiffusionstest mit <i>Porphyromonas gingivalis</i> , Plattenlayout B. Hemmhofbildung um Plättchen mit 0,25 µg Metronidazol (4), Hinokitiol 20 mM (8) und unverdünnter Mundspüllösung (15). Keine Hemmhofbildung bei DMSO (6), 10-prozentiger Mundspüllösung (16) und 1-prozentiger Mundspüllösung (17).....	35

Abbildung 18: Ergebnisse der Agardiffusionstests für <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; Metronidazol = Positivkontrolle, DMSO = Negativkontrolle, Hk = Hinokitiol; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle ($p(korr)=0,001$).....	35
Abbildung 19: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Positivkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung. Zahlreiche Bakterien sind als kugelförmige Strukturen erkennbar. Bei den flächigen Auflagerungen handelt es sich vermutlich um Reste des Flüssigmediums.	36
Abbildung 20: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Positivkontrolle) in 10000-facher Vergrößerung. Zahlreiche Bakterien sind als kugelförmige Strukturen erkennbar. Bei den flächigen Auflagerungen handelt es sich vermutlich um Reste des Flüssigmediums.	36
Abbildung 21: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Positivkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung. Neben kugelförmigen Bakterien ist die Implantatoberfläche als gebrochen-flächig erscheinende Struktur zu erkennen.....	36
Abbildung 22: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Inkubation in Speichel und Flüssigkultur von <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Positivkontrolle) in 10000-facher Vergrößerung. Neben kugelförmigen Bakterien ist die Implantatoberfläche als gebrochen-flächig erscheinende Struktur zu erkennen.....	36
Abbildung 23: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Inkubation in sterilem Flüssigmedium (Negativkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung zeigt eine bakterienfreie Implantatoberfläche.	37
Abbildung 24: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Inkubation in sterilem Flüssigmedium (Negativkontrolle) in 10000-facher Vergrößerung zeigt eine bakterienfreie Implantatoberfläche.	37
Abbildung 25: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Inkubation in sterilem Flüssigmedium (Negativkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung zeigt eine bakterienfreie Implantatoberfläche.	37

Abbildung 26: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Inkubation in sterilem Flüssigmedium (Negativkontrolle) in 5000-facher Vergrößerung zeigt eine bakterienfreie Implantatoberfläche. Die punktförmigen, uneben erscheinenden Strukturen (beispielsweise am oberen Bildrand in der linken Bildhälfte zu sehen) sind Bestandteil der Nanostruktur des 3iT3-Implantats.	37
Abbildung 27: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in HinokitioI in 5000-facher Vergrößerung. Es sind vereinzelt Bakterien vorhanden.....	38
Abbildung 28: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in HinokitioI in 10000-facher Vergrößerung. Es sind vereinzelt Bakterien vorhanden.	38
Abbildung 29: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in HinokitioI in 5000-facher Vergrößerung. Es sind wenige Bakterien sichtbar.	38
Abbildung 30: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in HinokitioI in 10000-facher Vergrößerung. Es sind wenige Bakterien sichtbar.	38
Abbildung 31: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung zeigt sehr wenige Bakterien.	39
Abbildung 32: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung zeigt sehr wenige Bakterien.	39
Abbildung 33: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.	39
Abbildung 34: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.	39
Abbildung 35: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung. Auf der Implantatoberfläche befinden sich viele Bakterien.....	40
Abbildung 36: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung. Auf der Implantatoberfläche befinden sich viele Bakterien.....	40

Abbildung 37: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats.	40
Abbildung 38: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Einbringen in physiologische Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats.	40
Abbildung 39: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 5000-facher Vergrößerung zeigt vereinzelte Bakterien auf der Implantatoberfläche.	41
Abbildung 40: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 10000-facher Vergrößerung zeigt vereinzelte Bakterien auf der Implantatoberfläche.	41
Abbildung 41: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 5000-facher Vergrößerung. Es sind keine Bakterien sichtbar.	41
Abbildung 42: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Hinokitiol in 10000-facher Vergrößerung. Es sind keine Bakterien sichtbar.	41
Abbildung 43: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung zeigt nur sehr wenige Bakterien.	42
Abbildung 44: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung zeigt nur sehr wenige Bakterien.	42
Abbildung 45: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 5000-facher Vergrößerung. Es sind kaum Bakterien vorhanden.	42
Abbildung 46: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit Chlorhexidin in 10000-facher Vergrößerung. Es sind kaum Bakterien vorhanden.	42
Abbildung 47: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.	43
Abbildung 48: Die REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem Gewindeanteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung zeigt einige Bakterien.	43

- Abbildung 49: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 5000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats. 43
- Abbildung 50: REM-Aufnahme eines Ausschnitts aus dem cervikalen Anteil eines Implantats nach Reinigung mit physiologischer Kochsalzlösung in 10000-facher Vergrößerung. Es sind einige Bakterien vorhanden, jedoch weniger als auf dem Gewindeanteil des Implantats. 43
- Abbildung 51: Ergebnisse des BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assays zur Quantifizierung der auf den Implantaten nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen bzw. Reinigungsmethoden verbliebenen Bakterien; n.c. = Negativkontrolle, p.c. = Positivkontrolle, ne = in physiologische Kochsalzlösung eingebrachte Implantate, he = in Hinokitiol eingebrachte Implantate, ce = in Chlorhexidin eingebrachte Implantate, nr = mit physiologischer Kochsalzlösung mechanisch gereinigte Implantate, hr = mit Hinokitiol mechanisch gereinigte Implantate, cr = mit Chlorhexidin mechanisch gereinigte Implantate; die Sternchen (*) markieren einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Positivkontrolle ($p=0,05$) 45
- Abbildung 52: Agardiffusionstest mit *Streptococcus mutans*. Das Paradoxe Inhibitionsphänomen imponiert als ringförmiger Bakterienrasen (siehe Pfeil) innerhalb des Hemmhofs in unmittelbarer Umgebung des mit Hinokitiol 2500 μM imprägnierten Wirkstoffträgers. 50

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verdünnungen der 20mM bzw. 40mM Hinokitiol-Stammlösungen für die Agardiffusionstests	18
Tabelle 2: Zur Bakterienkultivierung verwendete Nährmedien und Inkubationsmodalitäten	20
Tabelle 3: Für die Agardiffusionstests verwendete Nährmedien und Inkubationszeiten der verschiedenen Bakterien bis zum Ablesen der Hemmhofgrößen	20
Tabelle 4: Zusammensetzung der Hinokitiol-, Chlorhexidin- und Natriumchlorid-Lösungen im Hauptversuch zu den antibakteriellen Effekten von Hinokitiol auf Titanimplantaten.....	24
Tabelle 5: Versuchsgruppen im Hauptversuch zur quantitativen Analyse von Bakterien auf Titanimplantaten mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay.....	24
Tabelle 6: Legende zur Nummerierung der Testplättchen auf den Abbildungen 1-5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17	27
Tabelle 7: MICs und Hemmhofgrößen von Hinokitiol gegenüber oralpathogenen Bakterien diverser Studien	53

11. Abkürzungsverzeichnis

A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Abb.	Abbildung
aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
A. viscosus	Actinomyces viscosus
BacTiter-Glo	BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay
BHI	Brain Heart Infusion (Hirn-Herz-Bouillon)
BOP	Bleeding on Probing
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ce	eingbracht in Chlorhexidin
CHX	Chlorhexidin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cr	mechanisch gereinigt mit Chlorhexidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMS	Deutsche Mundgesundheitsstudie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMFT	Decayed/Missing/Filled Teeth (zerstörte/fehlende/gefüllte Zähne)
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
DG Paro	Deutsche Gesellschaft für Parodontologie
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
et al.	et alii
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FM	Flüssigmedium
FAA	Fastidious Anaerobe Agar (anspruchsvoller anaerober Agar)
F. nucleatum	Fusobacterium nucleatum
g	Gramm

ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
he	eingbracht in Hinokitiol
Hk	Hinokitiol
hr	mechanisch gereinigt mit Hinokitiol
HV	Hauptversuch
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
M	Medium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MH	Müller-Hinton-Agar mit Pferdeblut
MIC	minimum inhibitory concentration (minimale Hemmkonzentration)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
n	Anzahl Proben/Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
n.c.	negative control (Negativkontrolle)
ne	eingbracht in Natriumchlorid
nm	Nanometer
nr	mechanisch gereinigt mit Natriumchlorid
Nr.	Nummer
p	probabilitas; p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit

PA	Parodontitis
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
p.c.	positive control (Positivkontrolle)
PG	Prostaglandin
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PIP	paradoxes Inhibitionsphänomen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RLU	Relative Light Unit (Relative Lichteinheit)
SI	Le Système International d'Unités (Internationales Einheitensystem)
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TB	Thioglycolate Broth (Thioglycolat-Bouillon)
TNF	Tumornekrosefaktor
TST	Taschensondierungstiefe
TSYEA	Trypticase Soy Yeast Extract Agar (Trypton-Soja-Hefeextrakt-Agar)
TSYEM	Trypticase Soy Yeast Extract Medium (Trypton-Soja-Hefeextrakt-Medium)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

12. Anhang

12.1. Verwendete Materialien

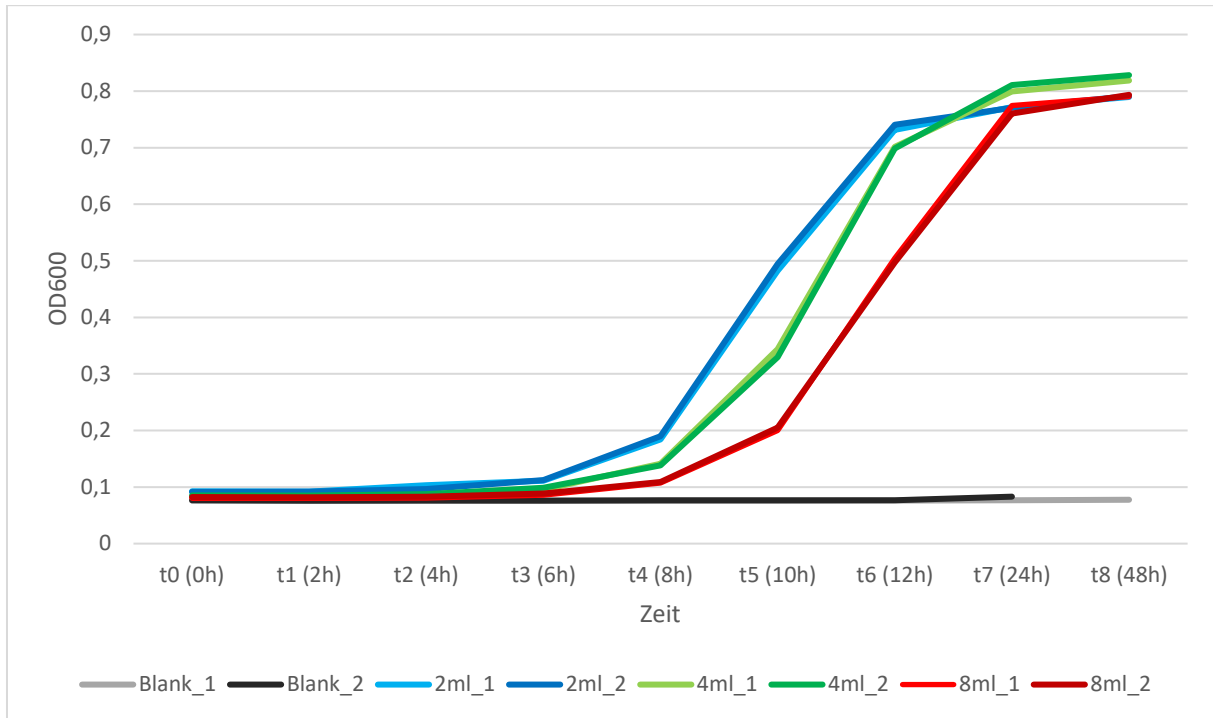
Name	Typ	Hersteller
Steri-Cult CO ₂ Incubator	Model 3311; S/N: 305165-212	Thermo Fisher Scientific
Innovens, Jouan (Inkubator)	234 EB2 CAB	Thermo Fisher Scientific
Hera safe (Sicherheitswerkbank)	40933941	Thermo Fisher Scientific
Denley Magmix (Magnetrührgerät)	01038	Thermo Fisher Scientific
Ring Stirrer Bars (Magnetrührer)	VWRI442-0520	VWR
827 pH lab (pH-Messgerät)	2.827.0214	Metrohm
Feinwaage (10 mg-100 g, e=1 mg, d=0,1 mg)	AEA-100A	Adam Equipment
Polymax 1040 (Schwenkgerät)	543-42205-00-3	Heidolph Instruments GmbH
Infinite Microplate-Reader	M200	Tecan
BioPhotometer (8,5 mm Lichtstrahlhöhe)	6131	Eppendorf
Vortex-Mischer	D-6012	neoLab
GasPak Inkubationsbehälter	260672	BD
Rasterelektronenmikroskop	Supra 55VP	Zeiss
Sputter-Coater	SC7620	Polaron
GloMax Navigator System	GM2000	Promega
Müller-Hinton-Agar mit Pferdeblut	PB5303A	Oxoid
Schaedler-Agar mit Vitamin K und 5 % Schafsblut	254042	BD
Fastidious Anaerobe Agar (FAA) mit Pferdeblut	PB0225A	Oxoid
BBL™ Yeast Extract	211929	BD
Tryptone Soya Broth	CM0129	Oxoid
Agar Bacteriological (Agar No. 1)	LP0011	Oxoid
Brain Heart Infusion Broth	53286-100G	Sigma-Aldrich
Thioglykolat Medium	1E12.1	Roth

Nunclon Delta Surface, steril (Petrischalen)	150350	Thermo Fisher Scientific
Testplättchen	146216	Munktell Filtrak
McFarland Equivalence Turbidity Standard 0,5	1307.1	Roth
McFarland Equivalence Turbidity Standard 1,0	R20411	Remel
Cryobank gemischt (4x20)	CRYO80G/M	Mast
UVette (50-2000 µl; Küvetten)	0030 106.300	Eppendorf
Raucotupf Stieltupfer, steril (kleiner Wattekopf)	137431	Lohmann & Rauscher
Pipettenspitzen 1000 µl	70.3050.020	Sarstedt
Pipettenspitzen 200 µl	70.3030.020	Sarstedt
Cellstar Tubes 50 ml (Falcons steril)	227261	Greiner Bio-One
Cellstar Tubes 15 ml (Falcons steril)	188 271-N	Greiner Bio-One
CRYO.S (Kryoröhrchen steril, 2 ml)	126279	Greiner Bio-One
Injekt Luer Solo (Spritzenkörper)	4606108V	B. Braun
Microlance (Injektionsnadel)	301300	BD
Sterile Syringe Filter, Polyethersulfone Membrane (Sterilfilter 0,2 µm)	514-0073	VWR
Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap (Mikroreaktionsgefäße)	72.690.550	Sarstedt
Anaerobe Container System (GasPaks)	260678	BD
Anaerobic indicator (Indikator für anaerobes Milieu)	BR0055B	Thermo Fisher Scientific
Plattierungsspatel, steril	86.1569.005	Sarstedt
DPBS (1X)	14190-144	Gibco
Einwegimpfösen, steril	612-9353	VWR
Cellstar (48-Wellplatten, steril, mit Deckel)	677 1880	Greiner Bio-One

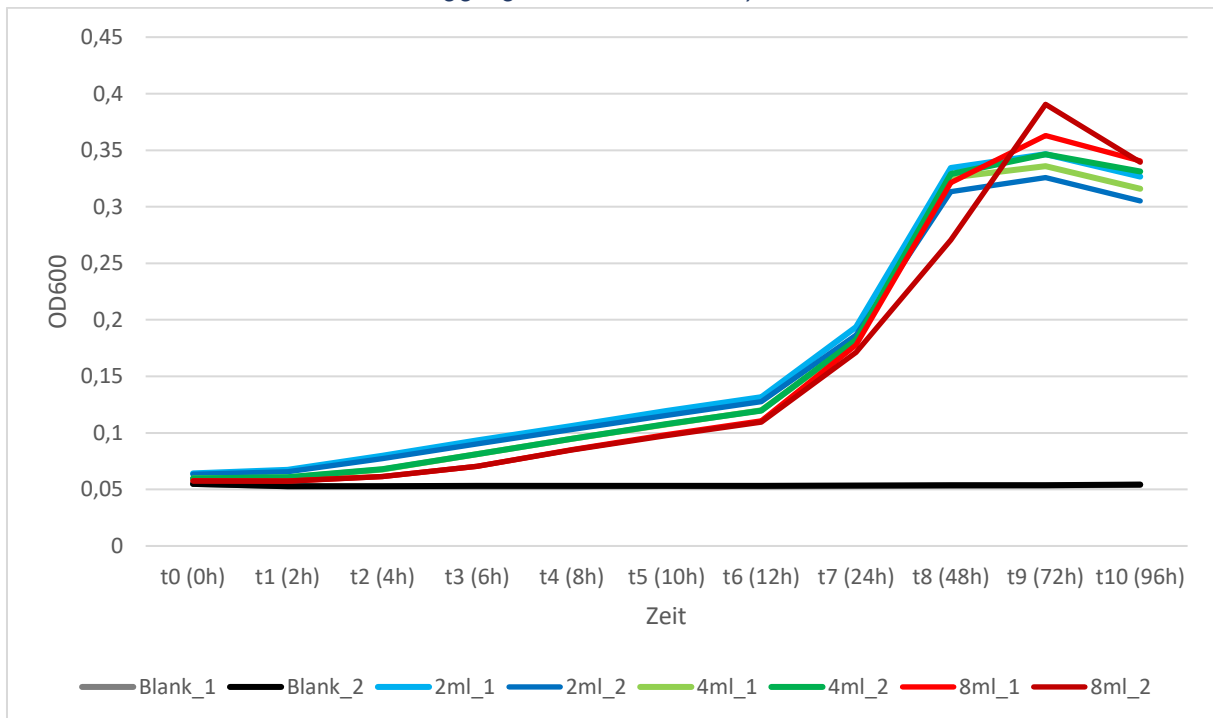
Kolbenhubpipette 100-1000 µl	1783995	Eppendorf
m200 (Kolbenhubpipette 20-200 µl)	5502776	Biohit
m100 (Kolbenhubpipette 10-100 µl)	MW02081	Biohit
m20 (Kolbenhubpipette 2-20 µl)	5505664	Biohit
Easypet (Pipettierhilfe)	9VDC	Eppendorf
Serologische Pipette 10 ml	86.1254.001	Sarstedt
Serologische Pipette 5 ml	86.1253.001	Sarstedt
Pele Tim No. 4 (Schaumstoffpellets)	2255	Voco
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	G8231	Promega
β-Thujaplicin	469521-5G	Sigma-Aldrich
Zinkchlorid	Z0014	TCI
Dr ZinX Mouth Sanitiser	B0872SDS63	Astivita Limited
Metronidazol	M3761-5G	Sigma-Aldrich
Metronidazol-Scheiben 5 mcg	CT0067B	Oxoid
Amoxicillin-Scheiben 10 mcg	CT0161B	Oxoid
Penicillin-G-Scheiben (1 unit)	CT0152B	Oxoid
Dimethylsulfoxid	A994.2	Roth
Glutardialdehyd 50 %	4995.1	Roth
Ethanol, vollvergällt 99%	27699	Otto Fischar GmbH
Glycerol	3783.1	Roth
Speikosept (CHX 2 %)	1056	Dr. Speier GmbH
Natriumchlorid	P029.3	Roth
Streptococcus mutans	20523	DSMZ
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	11123	DSMZ
Actinomyces viscosus	43327	DSMZ
Fusobacterium nucleatum	19507	DSMZ
Porphyromonas gingivalis	20709	DSMZ
Implantate (3i T3 mit DCD-Oberfläche)	BNPT4310	Biomet

12.2. Wachstumskurven

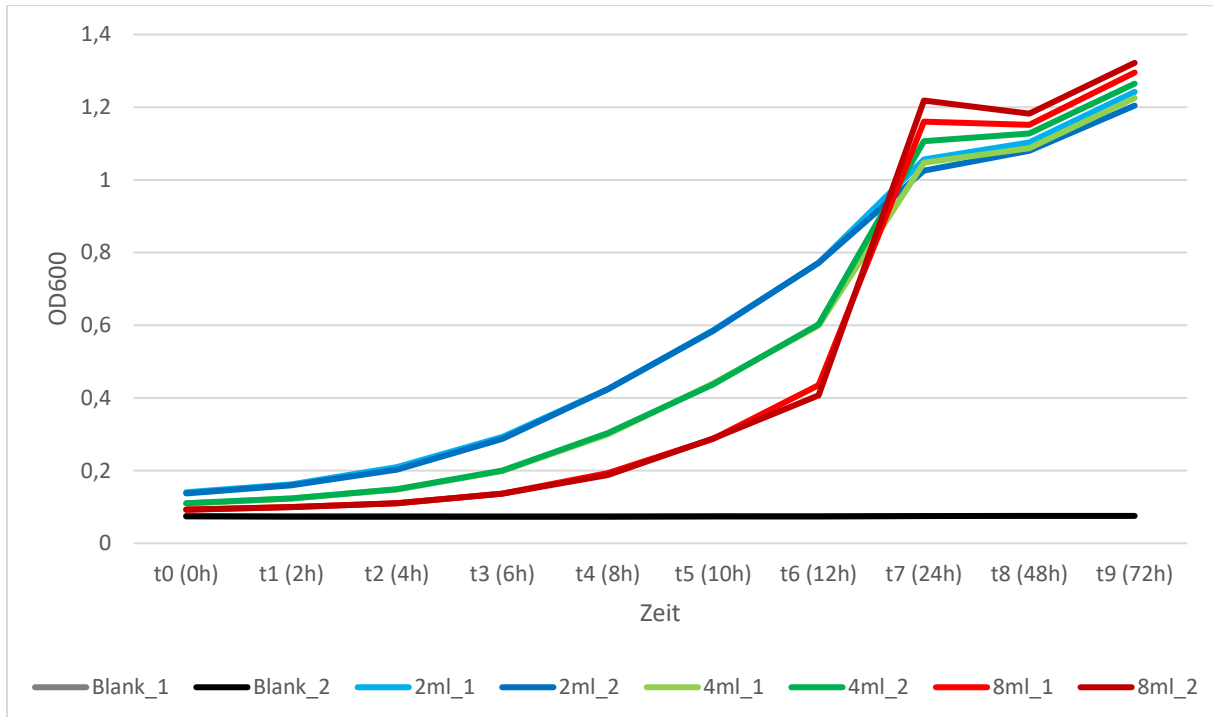
12.2.1. Wachstumskurve *Streptococcus mutans*



12.2.2. Wachstumskurve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*



12.2.3. Wachstumskurve *Actinomyces viscosus*



12.3. Statistische Auswertung der Agardiffusionstests

12.3.1. *Streptococcus mutans*

Mehrere Vergleiche

Abhängige Variable: Hemmhofgröße in mm

Bonferroni

(I) Getestete Substanzen	(J) getestete Substanz	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Penicillin G 1U (p.c.)	DMSO/FM (n.c.)	33,125*	,139	,000	32,62	33,63
	Hk2500µM	17,125*	,241	,000	16,24	18,01
	Hk500µM	24,000*	,241	,000	23,12	24,88
	Hk100µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	Hk20µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	Mundspüllösung	17,000*	,241	,000	16,12	17,88
	Mundspüllösung (10%)	25,000*	,241	,000	24,12	25,88

	Mundspüllösung (1%)	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 2500µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 500µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 100µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 0µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	33,125*	,241	,000	32,24	34,01
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	24,875*	,241	,000	23,99	25,76
	Hk500µM+ZnCl ₂ 20µM	24,375*	,241	,000	23,49	25,26
	Hk500µM+ZnCl ₂ 2500µM	24,375*	,241	,000	23,49	25,26
DMSO/ FM (n.c.)	Hk2500µM	-16,000*	,241	,000	-16,88	-15,12
	Hk500µM	-9,125*	,241	,000	-10,01	-8,24
	Hk100µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	Hk20µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	Mundspüllösung	-16,125*	,241	,000	-17,01	-15,24
	Mundspüllösung (10%)	-8,125*	,241	,000	-9,01	-7,24
	Mundspüllösung (1%)	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 2500µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 500µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 100µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 20µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	,000	,241	1,000	-,88	,88
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	-8,250*	,241	,000	-9,13	-7,37
	Hk500µM+ZnCl ₂ 20µM	-8,750*	,241	,000	-9,63	-7,87
Hk500µM+ZnCl ₂ 2500µM	-8,750*	,241	,000	-9,63	-7,87	

Hk2500 µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-17,125*	,241	,000	-18,01	-16,24
	Hk500µM	6,875*	,311	,000	5,74	8,01
	Hk100µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	Hk20µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	Mundspüllösung	-,125	,311	1,000	-1,26	1,01
	Mundspüllösung (10%)	7,875*	,311	,000	6,74	9,01
	Mundspüllösung (1%)	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 2500µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 500µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 100µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 20µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	16,000*	,311	,000	14,86	17,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	7,750*	,311	,000	6,61	8,89
	Hk500µM+ZnCl ₂ 20µM	7,250*	,311	,000	6,11	8,39
Hk500µM+ZnCl ₂ 2500µM	7,250*	,311	,000	6,11	8,39	
Hk500 µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-24,000*	,241	,000	-24,88	-23,12
	Hk100µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	Hk20µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	Mundspüllösung	-7,000*	,311	,000	-8,14	-5,86
	Mundspüllösung (10%)	1,000	,311	,234	-,14	2,14
	Mundspüllösung (1%)	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	ZnCl ₂ 2500µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	ZnCl ₂ 500µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	ZnCl ₂ 100µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	ZnCl ₂ 20µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26

	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	9,125*	,311	,000	7,99	10,26
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	,875	,311	,828	-,26	2,01
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	,375	,311	1,000	-,76	1,51
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	,375	,311	1,000	-,76	1,51
Hk100 µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	Hk20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	Mundspüllösung	-16,125*	,311	,000	-17,26	-14,99
	Mundspüllösung (10%)	-8,125*	,311	,000	-9,26	-6,99
	Mundspüllösung (1%)	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 2500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
Hk20µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	Mundspüllösung	-16,125*	,311	,000	-17,26	-14,99
	Mundspüllösung (10%)	-8,125*	,311	,000	-9,26	-6,99
	Mundspüllösung (1%)	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 2500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14

	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14	
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11	
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61	
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61	
Mundspül- lösung	Penicillin G 1U (p.c.)	-17,000*	,241	,000	-17,88	-16,12	
	Mundspüllösung (10%)	8,000*	,311	,000	6,86	9,14	
	Mundspüllösung (1%)	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 2500µM	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 500µM	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 100µM	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 20µM	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	16,125*	,311	,000	14,99	17,26	
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	7,875*	,311	,000	6,74	9,01	
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	7,375*	,311	,000	6,24	8,51	
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	7,375*	,311	,000	6,24	8,51	
	Mundspül- lösung (10%)	Penicillin G 1U (p.c.)	-25,000*	,241	,000	-25,88	-24,12
		Mundspüllösung (1%)	8,125*	,311	,000	6,99	9,26
ZnCl ₂ 2500µM		8,125*	,311	,000	6,99	9,26	
ZnCl ₂ 500µM		8,125*	,311	,000	6,99	9,26	
ZnCl ₂ 100µM		8,125*	,311	,000	6,99	9,26	
ZnCl ₂ 20µM		8,125*	,311	,000	6,99	9,26	
ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM		8,125*	,311	,000	6,99	9,26	
ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM		8,125*	,311	,000	6,99	9,26	
ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM		-,125	,311	1,000	-1,26	1,01	
Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM		-,625	,311	1,000	-1,76	,51	
Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM		-,625	,311	1,000	-1,76	,51	

Mundspül- lösung (1%)	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 2500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
ZnCl ₂ 2500µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
ZnCl ₂ 500 µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk20µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk100µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500µM+Hk500µM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61

ZnCl ₂ 100 μM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 20μM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500μM+Hk20μM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500μM+Hk100μM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500μM+Hk500μM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 20μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 2500μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
ZnCl ₂ 20 μM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 500μM+Hk20μM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500μM+Hk100μM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500μM+Hk500μM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 20μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 2500μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
ZnCl ₂ 500μM+ Hk20μM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 500μM+Hk100μM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
	ZnCl ₂ 500μM+Hk500μM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 20μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 2500μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
ZnCl ₂ 500μM+ Hk100 μM	Penicillin G 1U (p.c.)	-33,125*	,241	,000	-34,01	-32,24
	ZnCl ₂ 500μM+Hk500μM	-8,250*	,311	,000	-9,39	-7,11
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 20μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 2500μM	-8,750*	,311	,000	-9,89	-7,61
ZnCl ₂ 500μM+ Hk500 μM	Penicillin G 1U (p.c.)	-24,875*	,241	,000	-25,76	-23,99
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 20μM	-,500	,311	1,000	-1,64	,64
	Hk500μM+ ZnCl ₂ 2500μM	-,500	,311	1,000	-1,64	,64
	Penicillin G 1U (p.c.)	-24,375*	,241	,000	-25,26	-23,49

Hk500µM+ ZnCl ₂ 20µM	Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	,000	,311	1,000	-1,14	1,14
Hk500µM+ ZnCl ₂ 2500µM	Penicillin G 1U (p.c.)	-24,375*	,241	,000	-25,26	-23,49

*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0.05 signifikant.

12.3.2. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Mehrere Vergleiche

Abhängige Variable: Hemmhofgröße in mm

Bonferroni

(I) getestete Substanz	(J) getestete Substanz	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Amoxicillin 10µg (p.c.)	DMSO/FM (n.c.)	24,438*	,328	,000	23,35	25,52
	Hk2500µM	8,063*	,402	,000	6,73	9,39
	Hk500µM	15,188*	,402	,000	13,86	16,52
	Hk100µM	24,438*	,402	,000	23,11	25,77
	Hk20µM	24,438*	,402	,000	23,11	25,77
	Mundspüllösung	-,437	,402	1,000	-1,77	,89
	Mundspüllösung (10%)	9,313*	,402	,000	7,98	10,64
	Mundspüllösung (1%)	23,563*	,402	,000	22,23	24,89
DMSO/FM (n.c.)	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-24,437*	,328	,000	-25,52	-23,35

	Hk2500µM	-16,375*	,402	,000	-17,71	-15,04
	Hk500µM	-9,250*	,402	,000	-10,58	-7,92
	Hk100µM	,000	,402	1,000	-1,33	1,33
	Hk20µM	,000	,402	1,000	-1,33	1,33
	Mundspüllösung	-24,875*	,402	,000	-26,21	-23,54
	Mundspüllösung (10%)	-15,125*	,402	,000	-16,46	-13,79
	Mundspüllösung (1%)	-,875	,402	1,000	-2,21	,46
Hk2500µM	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-8,062*	,402	,000	-9,39	-6,73
	Hk500µM	7,125*	,464	,000	5,59	8,66
	Hk100µM	16,375*	,464	,000	14,84	17,91
	Hk20µM	16,375*	,464	,000	14,84	17,91
	Mundspüllösung	-8,500*	,464	,000	-10,04	-6,96
	Mundspüllösung (10%)	1,250	,464	,309	-,29	2,79
	Mundspüllösung (1%)	15,500*	,464	,000	13,96	17,04
Hk500µM	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-15,187*	,402	,000	-16,52	-13,86
	Hk100µM	9,250*	,464	,000	7,71	10,79
	Hk20µM	9,250*	,464	,000	7,71	10,79
	Mundspüllösung	-15,625*	,464	,000	-17,16	-14,09
	Mundspüllösung (10%)	-5,875*	,464	,000	-7,41	-4,34
	Mundspüllösung (1%)	8,375*	,464	,000	6,84	9,91
Hk100µM	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-24,437*	,402	,000	-25,77	-23,11

	Hk20µM	,000	,464	1,000	-1,54	1,54
	Mundspüllösung	-24,875*	,464	,000	-26,41	-23,34
	Mundspüllösung (10%)	-15,125*	,464	,000	-16,66	-13,59
	Mundspüllösung (1%)	-,875	,464	1,000	-2,41	,66
Hk20µM	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-24,437*	,402	,000	-25,77	-23,11
	Mundspüllösung	-24,875*	,464	,000	-26,41	-23,34
	Mundspüllösung (10%)	-15,125*	,464	,000	-16,66	-13,59
	Mundspüllösung (1%)	-,875	,464	1,000	-2,41	,66
Mundspüllösung	Amoxicillin 10µg (p.c.)	,438	,402	1,000	-,89	1,77
	Mundspüllösung (10%)	9,750*	,464	,000	8,21	11,29
	Mundspüllösung (1%)	24,000*	,464	,000	22,46	25,54
Mundspüllösung (10%)	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-9,312*	,402	,000	-10,64	-7,98
	Mundspüllösung (1%)	14,250*	,464	,000	12,71	15,79
Mundspüllösung (1%)	Amoxicillin 10µg (p.c.)	-23,562*	,402	,000	-24,89	-22,23

12.3.3. *Actinomyces viscosus*

Mehrere Vergleiche

Abhängige Variable: Hemmhofgröße in mm

Bonferroni

(I) getestete Substanz	(J) getestete Substanz	Mittelwert-differenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Unter-grenze	Ober-grenze
Penicillin G 1U (p.c.)	DMSO/FM (n.c.)	36,813*	,160	,000	36,28	37,34
	Hk40mM	12,813*	,196	,000	12,16	13,46
	Hk20mM	21,188*	,196	,000	20,54	21,84
	Hk10mM	36,813*	,196	,000	36,16	37,46
	Hk5mM	36,813*	,196	,000	36,16	37,46
	Mundspüllösung	23,438*	,196	,000	22,79	24,09
	Mundspüllösung (10%)	36,813*	,196	,000	36,16	37,46
	Mundspüllösung (1%)	36,813*	,196	,000	36,16	37,46
DMSO/FM (n.c.)	Penicillin G 1U (p.c.)	-36,812*	,160	,000	-37,34	-36,28
	Hk40mM	-24,000*	,196	,000	-24,65	-23,35
	Hk20mM	-15,625*	,196	,000	-16,27	-14,98
	Hk10mM	,000	,196	1,000	-,65	,65
	Hk5mM	,000	,196	1,000	-,65	,65
	Mundspüllösung	-13,375*	,196	,000	-14,02	-12,73
	Mundspüllösung (10%)	,000	,196	1,000	-,65	,65
	Mundspüllösung (1%)	,000	,196	1,000	-,65	,65

Hk40mM	Penicillin G 1U (p.c.)	-12,812*	,196	,000	-13,46	-12,16
	Hk20mM	8,375*	,226	,000	7,62	9,13
	Hk10mM	24,000*	,226	,000	23,25	24,75
	Hk5mM	24,000*	,226	,000	23,25	24,75
	Mundspüllösung	10,625*	,226	,000	9,87	11,38
	Mundspüllösung (10%)	24,000*	,226	,000	23,25	24,75
	Mundspüllösung (1%)	24,000*	,226	,000	23,25	24,75
Hk20mM	Penicillin G 1U (p.c.)	-21,187*	,196	,000	-21,84	-20,54
	Hk10mM	15,625*	,226	,000	14,87	16,38
	Hk5mM	15,625*	,226	,000	14,87	16,38
	Mundspüllösung	2,250*	,226	,000	1,50	3,00
	Mundspüllösung (10%)	15,625*	,226	,000	14,87	16,38
	Mundspüllösung (1%)	15,625*	,226	,000	14,87	16,38
Hk10mM	Penicillin G 1U (p.c.)	-36,812*	,196	,000	-37,46	-36,16
	Hk5mM	,000	,226	1,000	-,75	,75
	Mundspüllösung	-13,375*	,226	,000	-14,13	-12,62
	Mundspüllösung (10%)	,000	,226	1,000	-,75	,75
	Mundspüllösung (1%)	,000	,226	1,000	-,75	,75
Hk5mM	Penicillin G 1U (p.c.)	-36,812*	,196	,000	-37,46	-36,16
	Mundspüllösung	-13,375*	,226	,000	-14,13	-12,62

	Mundspüllösung (10%)	,000	,226	1,000	-,75	,75
	Mundspüllösung (1%)	,000	,226	1,000	-,75	,75
Mundspüllösung	Penicillin G 1U (p.c.)	-23,437*	,196	,000	-24,09	-22,79
	Mundspüllösung (10%)	13,375*	,226	,000	12,62	14,13
	Mundspüllösung (1%)	13,375*	,226	,000	12,62	14,13
Mundspüllösung (10%)	Penicillin G 1U (p.c.)	-36,812*	,196	,000	-37,46	-36,16
	Mundspüllösung (1%)	,000	,226	1,000	-,75	,75
Mundspüllösung (1%)	Penicillin G 1U (p.c.)	-36,812*	,196	,000	-37,46	-36,16

*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0.05 signifikant.

12.3.4. *Fusobacterium nucleatum*

Mehrere Vergleiche

Abhängige Variable: Hemmhofgröße in mm

Bonferroni

(I) getestete Substanz	(J) getestete Substanz	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Metronidazol 5µg (p.c.)	DMSO/FM (n.c.)	50,375*	,230	,000	49,58	51,17
	Hk40mM	36,625*	,281	,000	35,65	37,60
	Hk20mM	41,375*	,281	,000	40,40	42,35
	Hk10mM	50,375*	,281	,000	49,40	51,35

	Hk5mM	50,375*	,281	,000	49,40	51,35
	Mundspüllösung	40,625*	,281	,000	39,65	41,60
	Mundspüllösung (10%)	50,375*	,281	,000	49,40	51,35
	Mundspüllösung (1%)	50,375*	,281	,000	49,40	51,35
DMSO/FM (n.c.)	Metronidazol 5µg (p.c.)	-50,375*	,230	,000	-51,17	-49,58
	Hk40mM	-13,750*	,281	,000	-14,73	-12,77
	Hk20mM	-9,000*	,281	,000	-9,98	-8,02
	Hk10mM	,000	,281	1,000	-,98	,98
	Hk5mM	,000	,281	1,000	-,98	,98
	Mundspüllösung	-9,750*	,281	,000	-10,73	-8,77
	Mundspüllösung (10%)	,000	,281	1,000	-,98	,98
	Mundspüllösung (1%)	,000	,281	1,000	-,98	,98
Hk40mM	Metronidazol 5µg (p.c.)	-36,625*	,281	,000	-37,60	-35,65
	Hk20mM	4,750*	,325	,000	3,62	5,88
	Hk10mM	13,750*	,325	,000	12,62	14,88
	Hk5mM	13,750*	,325	,000	12,62	14,88
	Mundspüllösung	4,000*	,325	,000	2,87	5,13
	Mundspüllösung (10%)	13,750*	,325	,000	12,62	14,88
	Mundspüllösung (1%)	13,750*	,325	,000	12,62	14,88
Hk20mM	Metronidazol 5µg (p.c.)	-41,375*	,281	,000	-42,35	-40,40
	Hk10mM	9,000*	,325	,000	7,87	10,13

	Hk5mM	9,000*	,325	,000	7,87	10,13
	Mundspüllösung	-,750	,325	,967	-1,88	,38
	Mundspüllösung (10%)	9,000*	,325	,000	7,87	10,13
	Mundspüllösung (1%)	9,000*	,325	,000	7,87	10,13
Hk10mM	Metronidazol 5µg (p.c.)	-50,375*	,281	,000	-51,35	-49,40
	Hk5mM	,000	,325	1,000	-1,13	1,13
	Mundspüllösung	-9,750*	,325	,000	-10,88	-8,62
	Mundspüllösung (10%)	,000	,325	1,000	-1,13	1,13
	Mundspüllösung (1%)	,000	,325	1,000	-1,13	1,13
Hk5mM	Metronidazol 5µg (p.c.)	-50,375*	,281	,000	-51,35	-49,40
	Mundspüllösung	-9,750*	,325	,000	-10,88	-8,62
	Mundspüllösung (10%)	,000	,325	1,000	-1,13	1,13
	Mundspüllösung (1%)	,000	,325	1,000	-1,13	1,13
Mundspüllösung	Metronidazol 5µg (p.c.)	-40,625*	,281	,000	-41,60	-39,65
	Mundspüllösung (10%)	9,750*	,325	,000	8,62	10,88
	Mundspüllösung (1%)	9,750*	,325	,000	8,62	10,88
Mundspüllösung (10%)	Metronidazol 5µg (p.c.)	-50,375*	,281	,000	-51,35	-49,40
	Mundspüllösung (1%)	,000	,325	1,000	-1,13	1,13

Mundspüllösung (1%)	Metronidazol 5µg (p.c.)	-50,375*	,281	,000	-51,35	-49,40
---------------------	-------------------------	----------	------	------	--------	--------

*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0.05 signifikant.

12.3.5. *Porphyromonas gingivalis*

Mehrere Vergleiche

Abhängige Variable: Hemmhofgröße in mm

Bonferroni

(I) getestete Substanz	(J) getestete Substanz	Mittelwertdifferenz (I-J)	Std.-Fehler	Sig.	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Metronidazol 0,25µg	DMSO (n.c.)	39,625*	,571	,000	37,73	41,52
	Hk40mM	15,000*	,699	,000	12,68	17,32
	Hk20mM	20,750*	,699	,000	18,43	23,07
	Hk10mM	24,250*	,699	,000	21,93	26,57
	Hk5mM	26,875*	,699	,000	24,56	29,19
	Mundspüllösung	26,125*	,699	,000	23,81	28,44
	Mundspüllösung (10%)	39,625*	,699	,000	37,31	41,94
	Mundspüllösung (1%)	39,625*	,699	,000	37,31	41,94
DMSO (n.c.)	Metronidazol 0,25µg	-39,625*	,571	,000	-41,52	-37,73
	Hk40mM	-24,625*	,699	,000	-26,94	-22,31
	Hk20mM	-18,875*	,699	,000	-21,19	-16,56
	Hk10mM	-15,375*	,699	,000	-17,69	-13,06
	Hk5mM	-12,750*	,699	,000	-15,07	-10,43
	Mundspüllösung	-13,500*	,699	,000	-15,82	-11,18

	Mundspüllösung (10%)	,000	,699	1,000	-2,32	2,32
	Mundspüllösung (1%)	,000	,699	1,000	-2,32	2,32
Hk40mM	Metronidazol 0,25µg	-15,000*	,699	,000	-17,32	-12,68
	Hk20mM	5,750*	,807	,000	3,07	8,43
	Hk10mM	9,250*	,807	,000	6,57	11,93
	Hk5mM	11,875*	,807	,000	9,20	14,55
	Mundspüllösung	11,125*	,807	,000	8,45	13,80
	Mundspüllösung (10%)	24,625*	,807	,000	21,95	27,30
	Mundspüllösung (1%)	24,625*	,807	,000	21,95	27,30
Hk20mM	Metronidazol 0,25µg	-20,750*	,699	,000	-23,07	-18,43
	Hk10mM	3,500*	,807	,002	,82	6,18
	Hk5mM	6,125*	,807	,000	3,45	8,80
	Mundspüllösung	5,375*	,807	,000	2,70	8,05
	Mundspüllösung (10%)	18,875*	,807	,000	16,20	21,55
	Mundspüllösung (1%)	18,875*	,807	,000	16,20	21,55
Hk10mM	Metronidazol 0,25µg	-24,250*	,699	,000	-26,57	-21,93
	Hk5mM	2,625	,807	,061	-,05	5,30
	Mundspüllösung	1,875	,807	,819	-,80	4,55
	Mundspüllösung (10%)	15,375*	,807	,000	12,70	18,05
	Mundspüllösung (1%)	15,375*	,807	,000	12,70	18,05

Hk5mM	Metronidazol 0,25µg	-26,875*	,699	,000	-29,19	-24,56
	Mundspüllösung	-,750	,807	1,000	-3,43	1,93
	Mundspüllösung (10%)	12,750*	,807	,000	10,07	15,43
	Mundspüllösung (1%)	12,750*	,807	,000	10,07	15,43
Mundspüllösung	Metronidazol 0,25µg	-26,125*	,699	,000	-28,44	-23,81
	Mundspüllösung (10%)	13,500*	,807	,000	10,82	16,18
	Mundspüllösung (1%)	13,500*	,807	,000	10,82	16,18
Mundspüllösung (10%)	Metronidazol 0,25µg	-39,625*	,699	,000	-41,94	-37,31
	Mundspüllösung (1%)	,000	,807	1,000	-2,68	2,68
Mundspüllösung (1%)	Metronidazol 0,25µg	-39,625*	,699	,000	-41,94	-37,31

*. Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0.05 signifikant.

12.4. Statistische Auswertung der Bakterienquantifizierung auf Implantaten mittels BacTiter-Glo Microbial Cell Viability Assay

ONEWAY deskriptive Statistiken

LumGes

	N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Std.-Fehler	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
					Untergrenze	Obergrenze
NC	8	469,2500	74,81549	26,45127	406,7027	531,7973
PC	16	3043,7500	762,58224	190,64556	2637,3986	3450,1014
NE	16	1222,4375	219,69523	54,92381	1105,3702	1339,5048
HE	16	932,8750	113,68018	28,42005	872,2991	993,4509
CE	16	602,4375	45,99416	11,49854	577,9289	626,9461
NR	16	1477,5000	296,50183	74,12546	1319,5053	1635,4947
HR	16	1019,6250	220,91382	55,22846	901,9083	1137,3417
CR	16	501,0000	43,18024	10,79506	477,9909	524,0091
Gesamt	120	1204,5667	854,46846	78,00194	1050,1150	1359,0183

Tests auf Normalverteilung

	Gruppe	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
LumGes	NC	,230	8	,200*	,892	8	,244
	PC	,266	16	,004	,839	16	,009
	NE	,139	16	,200*	,923	16	,185
	HE	,139	16	,200*	,936	16	,298
	CE	,187	16	,137	,904	16	,093
	NR	,208	16	,062	,915	16	,141
	HR	,158	16	,200*	,918	16	,155
	CR	,139	16	,200*	,947	16	,444

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Test der Homogenität der Varianzen

		Levene- Statistik	df1	df2	Signifikanz
LumGes	Basiert auf dem Mittelwert	37,064	7	112	,000
	Basiert auf dem Median	16,882	7	112	,000
	Basierend auf dem Median und mit angepaßten df	16,882	7	24,574	,000
	Basiert auf dem getrimmten Mittel	34,514	7	112	,000

Einfaktorielle ANOVA

LumGes

	Quadrat- summe	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	75093407,592	7	10727629,656	101,904	,000
Innerhalb der Gruppen	11790437,875	112	105271,767		
Gesamt	86883845,467	119			

Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: LumGes

Games-Howell

(I) Gruppe	(J) Gruppe	Mittlere Differenz (I-J)	Std.-Fehler	Signifi-kanz	95%-Konfidenzintervall	
					Unter-grenze	Ober-grenze
NC	PC	-2574,50000*	192,47181	,000	-3243,3177	-1905,6823
	NE	-753,18750*	60,96142	,000	-958,2589	-548,1161
	HE	-463,62500*	38,82485	,000	-594,4886	-332,7614
	CE	-133,18750*	28,84243	,015	-242,0017	-24,3733
	NR	-1008,25000*	78,70358	,000	-1276,0036	-740,4964
	HR	-550,37500*	61,23603	,000	-756,4107	-344,3393
	CR	-31,75000	28,56927	,939	-140,3664	76,8664
PC	NC	2574,50000*	192,47181	,000	1905,6823	3243,3177
	NE	1821,31250*	198,39948	,000	1142,0901	2500,5349
	HE	2110,87500*	192,75225	,000	1441,6422	2780,1078
	CE	2441,31250*	190,99200	,000	1774,8561	3107,7689
	NR	1566,25000*	204,54905	,000	874,5344	2257,9656
	HR	2024,12500*	198,48403	,000	1344,7415	2703,5085
	CR	2542,75000*	190,95094	,000	1876,3563	3209,1437
NE	NC	753,18750*	60,96142	,000	548,1161	958,2589
	HE	289,56250*	61,84112	,002	83,5313	495,5937
	CE	620,00000*	56,11454	,000	426,2178	813,7822
	NR	-255,06250	92,25621	,146	-557,0461	46,9211
	HR	202,81250	77,88971	,194	-50,6172	456,2422
	CR	721,43750*	55,97462	,000	527,8958	914,9792
HE	NC	463,62500*	38,82485	,000	332,7614	594,4886

	CE	330,43750*	30,65804	,000	226,9625	433,9125
	NR	-544,62500*	79,38692	,000	-813,2633	-275,9867
	HR	-86,75000	62,11184	,849	-293,7457	120,2457
	CR	431,87500*	30,40119	,000	328,9549	534,7951
CE	NC	133,18750*	28,84243	,015	24,3733	242,0017
	NR	-875,06250*	75,01200	,000	-1135,3788	-614,7462
	HR	-417,18750*	56,41275	,000	-612,0220	-222,3530
	CR	101,43750*	15,77180	,000	50,1064	152,7686
NR	NC	1008,25000*	78,70358	,000	740,4964	1276,0036
	HR	457,87500*	92,43790	,001	155,3595	760,3905
	CR	976,50000*	74,90739	,000	716,3540	1236,6460
HR	NC	550,37500*	61,23603	,000	344,3393	756,4107
	CR	518,62500*	56,27358	,000	324,0295	713,2205
CR	NC	31,75000	28,56927	,939	-76,8664	140,3664

13. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Folwaczny, herzlich dafür danken, mir die Erstellung dieser Doktorarbeit ermöglicht und die Arbeitsmaterialien und den Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt zu haben. Er hat den Fortschritt des Projektes im Rahmen mehrerer Präsentationen verfolgt und mit hilfreichen Tipps unterstützt. Dafür und für die Hilfe bei der statistischen Auswertung bin ich sehr dankbar.

Auch den beiden weiteren Betreuern dieser Dissertation, Frau Prof. Ilie und Frau Prof. Liebermann, möchte ich meinen Dank für die Mitbetreuung aussprechen.

Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dr. Spinell, der als direkter Ansprechpartner stets ein offenes Ohr hatte und mit zahlreichen Besprechungen maßgeblich am Fortschritt dieses Projekts beteiligt war – zusammen konnten wir viele Probleme, die sich im Rahmen der Experimente ergaben, lösen. Weiterhin möchte ich ihm für die Beschaffung des Probenmaterials danken.

Auch ein herzliches Dankeschön an Frau Hackl und Frau Dr. Diegelmann, die mir bei Fragen im Labor immer freundlich und aufmunternd mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Außerdem danke ich Frau Dachs und Frau Köbele für die Kooperation bei der Aufnahme der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter, die mich stets liebevoll und tatkräftig unterstützt. Ohne ihren Rückhalt wären Studium und Dissertation viel schwerer umsetzbar gewesen.

14. Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Seegerer, Anna Maria

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die antibakterielle Wirkung von ~~Hinokitiol~~ und Zink

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bad Feilnbach, 08.03.2026

Ort, Datum

Anna Maria Seegerer

Unterschrift Anna Maria Seegerer

15. Übereinstimmungserklärung



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Seegerer, Anna Maria

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

Die antibakterielle Wirkung von ~~Hinokitiol~~ und Zink

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Bad Feilnbach, 08.03.2026

Ort, Datum

Anna Maria Seegerer

Unterschrift Anna Maria Seegerer